

**Etablierung einer embryonalen cDNA-Bibliothek und Klonierung
eines FGFR-Homologs aus *Enchytraeus coronatus*
(Annelida, Oligochaeta)**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Cyrill Brand
aus Hofgeismar

Marburg/ Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

angenommen

Erstgutachter: PD Dr. Achim Paululat

Zweitgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am 3.6. 2002

Titelbild: Embryonen von *Enchytraeus coronatus*. Fluoreszenzfärbung eines Tag-7 Embryos (oberes Bild) und eines Tag-2 Embryos (unteres Bild).

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Etablierung einer embryonalen cDNA-Bibliothek und Klonierung eines FGFR-Homologs aus *Enchytraeus coronatus* (Annelida, Oligochaeta)

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Die systematische Stellung der Anneliden	2
2.2. <i>Enchytraeus coronatus</i>	4
2.3. Die Differenzierung des Mesoderms und der Bewegungsmuskulatur	5
2.4. An der Mesodermendifferenzierung von Anneliden beteiligte Kandidatengene	8
2.5. Die Eigenschaften einer embryonalen cDNA-Bibliothek	9
2.6. Fragestellung und Zielsetzung	12
3. Material und Methoden	13
I. Material	13
3.1. Geräte	13
3.2. Chemikalien	14
3.3. Radioisotope	16
3.4. Enzyme	17
3.5. Fertige Reagenziensätze	17
3.5.1. DNA/RNA-Marker	18
3.6. Synthetische Oligonukleotide	18
3.7. Plasmide	22
3.9. Antikörper und Seren	22
II. Methoden	23
3.10. Stammhaltung von <i>Enchytraeus coronatus</i>	23
3.11. Sammeln von Kokons	24
3.12. Fixierung und Präparation von Kokons	24
3.13. Herstellung von Schnittpräparaten	25
3.14. DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258	26
3.15. Aktinfärbungen mit Phalloidin	27
3.16. Isolierung genomischer DNA aus <i>Enchytraeus coronatus</i>	27
3.17. Präparation von RNA aus <i>Enchytraeus coronatus</i>	28
3.18. Polymerasekettenreaktion („PCR“)	29
3.18.1. RT-PCR („Reverse Transkription“-PCR)	30
3.18.2. Touchdown PCR	31
3.18.3. RACE-PCR („rapid amplification of cDNA ends“)	31
3.18.4. <i>in situ</i> RT-PCR	31
3.19. Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	33
3.20. Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	34
3.20.1. Enzymatische Spaltung von DNA	35
3.20.2. Ungerichtete Klonierung von DNA in Plasmidvektoren	36
3.20.3. Ligation und Klonierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kits“	37
3.20.4. „Shotgun“-Klonierung	38
3.21. Herstellung kompetenter Zellen nach Rubidiumchlorid-Methode	39
3.22. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid DNA	40
3.23. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
3.23.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
3.23.2. Midi-Präparation von Plasmid-DNA	41
3.24. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	43
3.25. Sequenzierung doppelsträngiger DNA	43
3.26. Sondenmarkierung	46
3.27. Southern-Blot	48
3.28. Northern Blot	51
3.29. Herstellung einer embryonalen cDNA-Bibliothek	51
3.29.1. PCR-basierte Generierung einer cDNA-Bibliothek in λ -TriplEx	52
3.29.2. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek ohne PCR Amplifikation	56
3.30. Durchmustern einer Bibliothek durch Hybridisierung mit einer DNA Sonde	59
3.30.1. Hybridisierung	59

3.30.2. Isolierung eines Einzelphagen und Präparation von Phagen-DNA	61
3.31. Antikörperfärbung.....	62
3.32. <i>in situ</i> -Hybridisierung (<i>E. coronatus</i>).....	63
4. Ergebnisse	66
4.1. Verifizierung der embryonalen cDNA-Bibliotheken von <i>Enchytraeus coronatus</i>	66
4.1.1. Verifizierung der Triplex-Bibliothek.....	66
4.1.2. Verifizierung der λ -Zap-Bibliothek	67
4.2. Weitere Analysen zur Qualität der hergestellten cDNA-Bibliotheken	67
4.3. Durchmusterung der Bibliotheken und Isolierung eines <i>RTK</i> -homologen Fragments.....	69
4.3.1. Durchmusterung mit heterologen Sonden.....	69
4.3. Isolierung eines Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) Fragments	70
4.4. Northern Blot und Southern Blot Analyse von RTK1	72
4.4.1. Northern Blot.....	72
4.4.2. Southern Blot Analyse.....	73
4.5. Vervollständigung der partiellen RTK1-cDNA mit Hilfe von PCR-Techniken.....	74
4.5.1. Erststrangsynthese	74
4.5.2. RACE-PCR	74
4.6. Sequenzvergleich <i>rtk1</i> -orthologer Gene	77
4.7. Phylogeniebetrachtungen von RTK1	79
4.8. RTK1-spezifische <i>in situ</i> RT-PCR an Gewebeschnitten.....	80
4.9. Isolierung einer weiteren Rezeptor-Tyrosin-Kinase.....	82
4.10. Antikörperfärbungen an <i>E. coronatus</i>	84
4.10.1. Antikörperfärbung mit Phospho-Histon PH3 Antikörper	84
4.10.2. Antikörperfärbungen mit Anti-Tubulin (acetyliert) Antikörper	85
5. Diskussion.....	87
5.1. Konstruktion von cDNA-Bibliotheken aus <i>Enchytraeus coronatus</i>	87
5.2. Das RTK1-Fragment aus <i>E. coronatus</i>	88
5.3. Das RTK2-Fragment aus <i>E. coronatus</i>	90
5.4. Antikörperfärbung	91
5.4.1. Antikörperfärbungen mit einem Anti-Tubulin Antikörper zeigen ein nicht verschmolzenes Strickleiternnervensystem.....	91
5.6. <i>in situ</i> Hybridisierung	92
5.6.1. <i>In situ</i> -RT-PCR an <i>Enchytraeus coronatus</i>	93
5.7. Mögliche Funktion von RTK1	94
5.8. Ausblick.....	95
6. Literaturverzeichnis.....	96
7. Abkürzungen.....	110

1. Zusammenfassung

Ein Schwerpunkt in der modernen Entwicklungsbiologie ist die Differenzierung des Mesoderms. Vergleichende Untersuchungen dieses Prozesses werden mit der Hilfe von bereits gut verstandenen Modellsystemen wie dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* und der Taufliege *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Weitere Tiersysteme sollten der Fragestellung zusätzliche Informationen liefern, wie die Differenzierung des Mesoderms im Laufe der Evolution an Komplexität gewinnen konnte. Die in neueren Systematiken vorgestellte Gruppe der Lophotrochozoa sollte hierzu einen großen Beitrag leisten können. Die Organismen dieser Gruppe bilden innerhalb der Evertebraten den Übergang von einfachen Organisationsformen zu hochkomplexen Arten. Ein Vertreter dieser Gruppe, der Annelid *Enchytraeus coronatus* steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Ziel der Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung einer embryonalen cDNA-Bibliothek, die alle Entwicklungsstadien von *Enchytraeus coronatus* beinhalten sollte. Es war möglich, verschiedene embryonale cDNA-Bibliotheken zu etablieren. Mit diesen Bibliotheken sollte ein Gen isoliert werden, dass für einen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) kodiert. Dieses isolierte Fragment sollte in *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt werden, um die Expression des Gens zu verfolgen und Anhaltspunkte über die Funktion zu liefern. Die Durchmusterung ergab ein cDNA-Fragment, dass mit Hilfe von Sequenzanalysen und Phylogeniastudien eindeutig der Familie der FGFRs zugeordnet werden konnte. Die größte Homologie wurde zu dem *Drosophila* Gen *heartless* und seiner Orthologe gefunden. Weiterhin wurde über PCR-Methoden versucht, die vollständige cDNA des FGFRs zu isolieren. Insgesamt konnten 3,1 kb der cDNA isoliert werden, in der sich vermutlich der komplette offene Leserahmen des FGFR befindet.

2. Einleitung

Einen Schwerpunkt in der modernen Entwicklungsbiologie bildet die Frage, wie aus undifferenziertem Gewebe das Mesoderm und später die Muskulatur entsteht. Bislang untersuchte Organismen wie die Taufliege *Drosophila melanogaster* oder der Nematode *Caenorhabditis elegans* bieten detaillierte Einblicke in diese Prozesse. Um die Evolution solcher Prozesse vergleichend untersuchen zu können, sollten weitere Tiersysteme herangezogen werden. Diese bieten mögliche Erklärungsansätze, wie die Prozesse der Mesodermentwicklung und der Myogenese an Komplexität gewinnen konnten. Zunächst werden hier verschiedene Phylogeniemodelle vorgestellt. Es schließt sich ein Überblick über die Mesodermendifferenzierung an, mit besonderem Fokus auf den Oligochaeten *Enchytraeus coronatus*. Nach einem Überblick über die Methode der Synthese von cDNA-Bibliotheken werden Fragestellung und Zielsetzung dargestellt.

2.1. Die systematische Stellung der Anneliden

Im Gegensatz zu den Systematiken bis Ende des 20. Jahrhunderts, die von rein morphologischen Betrachtungen ausgehen, stützen sich viele neuere Systematiken der Metazoa bei der Erstellung von Stammbäumen auf den Vergleich der 18S rRNA-Gensequenzen. Weit verbreitet ist auch der Vergleich der frühen Embryonalstadien der Metazoen, wobei hier das Vorhandensein von 2 oder 3 Keimblättern und eines Coeloms entscheidende Bedeutung hat. Ein entsprechender Stammbaum wird nach Komplexität aufsteigend gegliedert, mit den Schwämmen an der Basis, die weder eine Symmetrie aufweisen noch Gewebeorganisation zeigen. Sie verfügen nur über einige Zelltypen und bilden kein Nervengewebe aus (Adoutte *et al.*, 1999). An der Spitze stehen die Chordata mit drei Keimblättern, vorhandenem Coelom, einem komplexen Nervensystem und einem ausdifferenzierten bilateralen Körperbau (Abb. 2.1.A).

Die Gliederung des Stammbaums der Metazoa mit Hilfe von molekularen Daten, basierend auf dem Vergleich der 18S rRNA wurde erstmals von Field *et al.* Ende der 80er des letzten

Jahrhunderts durchgeführt und brachte erstaunliche Ergebnisse (Field *et al.*, 1988). Demnach könnte der Stammbaum der Metazoa neu geordnet werden. Unter anderem ist folgendes für die weiteren Betrachtungen wichtig: Die Annelida gelten nicht mehr länger als Schwestergruppe der Arthropoda, sondern bilden gemeinsam mit den Molluska, Brachiopoda, Nemertini und Plathelminthes die Lophotrochozoa (Abb. 2.1.B). Dies konnte auch durch weitere Daten, wie die Analyse mit 28S rRNA-Gensequenzen (Christen *et al.*, 1991; Mallat and Winchell, 2002) und Hox-Sequenzen (Adoutte *et al.*, 2000) verifiziert werden.

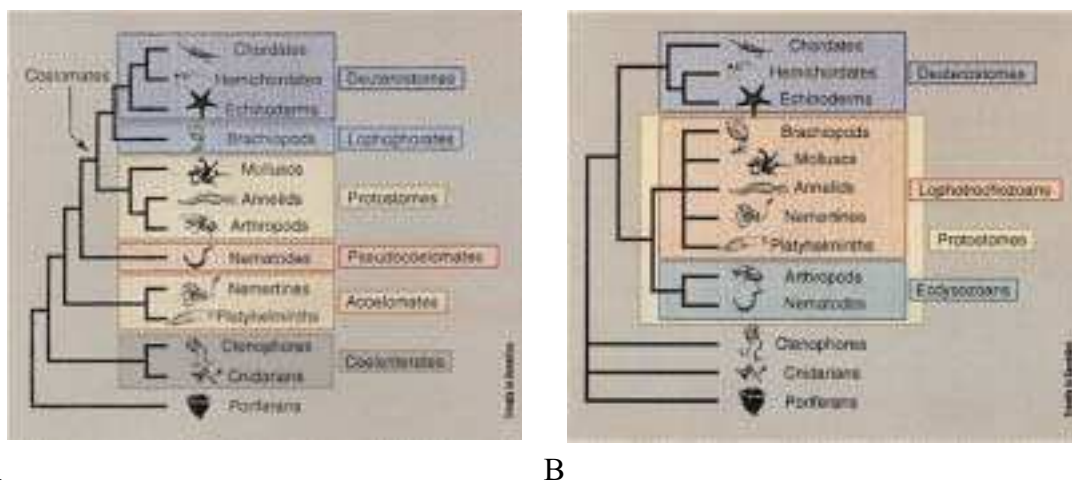


Abb. 2.1.: Phylogenetische Einteilung der Metazoa. (A) Beispiel eines traditionellen Stammbaums, wie er in den meisten Veröffentlichungen dargestellt wird (nach: Hyman, 1940). (B) Phylogenetischer Stammbaum auf der Basis der 18S rRNA Analyse (nach: Halanych *et al.*, 1997; Aguinaldo *et al.*, 1997). Die Stammbäume sind aufsteigend nach der Komplexität der Gestalt geordnet (aus: Adoutte *et al.*, 1999).

Alle bislang bestehenden Modellorganismen in der modernen Entwicklungsbiologie rekrutieren sich aus den Deuterostomiern, Ecdysozoa oder den Cnidaria. Da die Gruppe der Lophotrochozoa einen großen Beitrag zum Verständnis der evolutiven Prozesse leisten kann, ist es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, einen Vertreter dieser Gruppe, den Oligochaeten *Enchytraeus coronatus* näher zu charakterisieren und ihn für entwicklungsbiologische Fragestellungen zugänglich zu machen.

2.2. *Enchytraeus coronatus*

Enchytraeus coronatus gehört aufgrund seines Körperbaus zu den ursprünglichsten Arten innerhalb der Oligochaeta (Farraguti and Ersus, 1999; Ersus *et al.*, 2000). Seine Entwicklung verläuft direkt, ohne ein Larvenstadium. Der Zeitraum der Embryonalentwicklung beträgt 9 Tage. Für einen kompletten Generationszyklus von der Kokonablage bis zur Geschlechtsreife benötigt *E. coronatus* 13 Tage bei 18 °C.

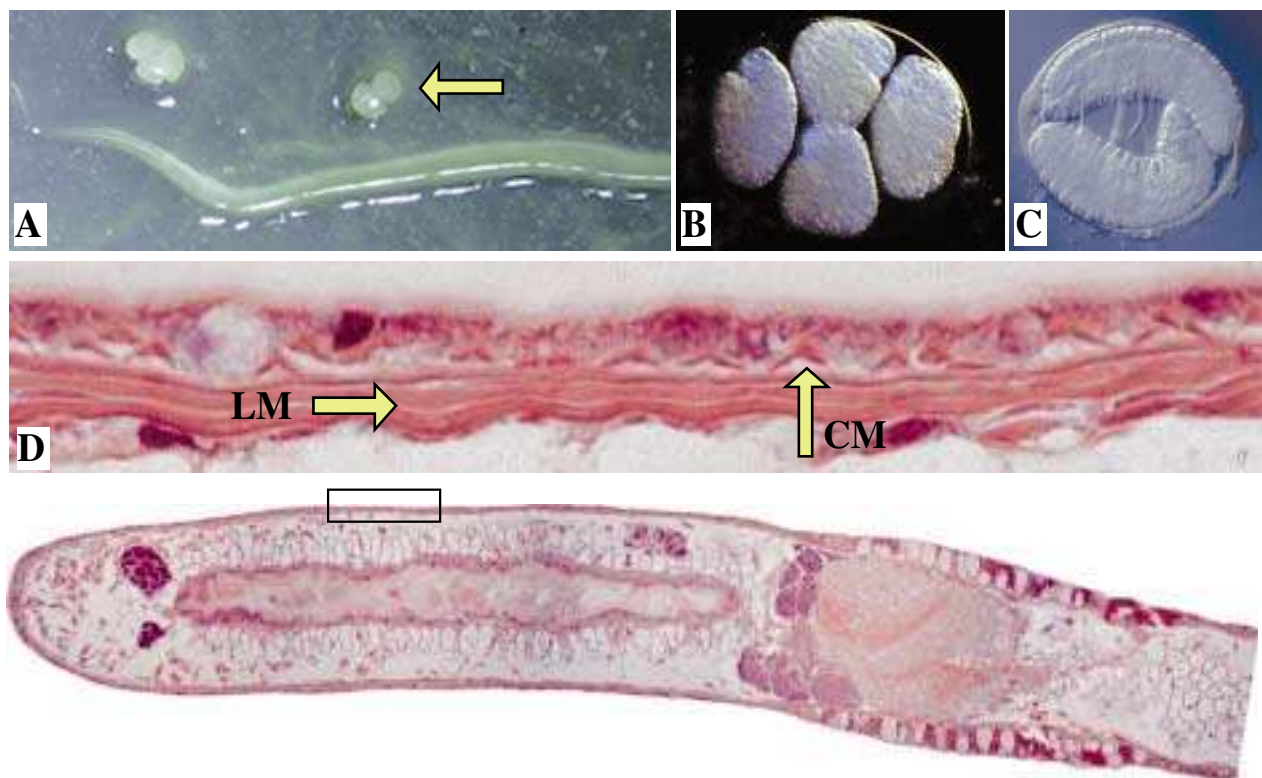


Abb. 2.5.: *Enchytraeus coronatus*. (A) Adultes Tier und frisch gelegter Kokon. (B) Kokon mit 2 Tage alten Embryonen. (C) Kokon mit 4 Tage alten Embryonen. (D) Längsschnitt durch ein adultes Tier. Ausschnittvergrößerung des Hautmuskelschlauchs. (CM) Ringmuskulatur, (LM) Längsmuskulatur. (Tafel bereitgestellt von A. Paululat)

E. coronatus bietet sich als Untersuchungsobjekt an, da er unter Laborbedingungen problemlos gehalten und vermehrt werden kann (Christensen, 1956; Ebershold, 1989; Brand, 1999). Der gelegte Kokon ist durchsichtig und enthält 2 bis 4 Embryonen (Abb. 2.5.B,C). Seine kurze Generationszeit, die direkte Entwicklung und sein ursprünglicher Körperbau (Prof. L. v. Salvani-Plawen, Wien; Prof. W. Dohle, Berlin, pers. Mitteilungen; Jamieson, 1981) sind weitere Vorteile,

genauso wie seine terrestrische Lebensweise, was die Haltung im Labor im Gegensatz zu marinen Arten vereinfacht. Molekularbiologisch und histochemisch konnten schon die ersten Protokolle etabliert werden (Brand, 1999; Bergter, 2001).

2.3. Die Differenzierung des Mesoderms und der Bewegungsmuskulatur

Wie schon erwähnt, gehören die Differenzierungsprozesse von ursprünglich gleichen Zellen in komplexe Gewebe zu den interessantesten Untersuchungsobjekten in der Entwicklungsbiologie. Einer dieser Prozesse ist die Bildung des Mesoderms und der sich daraus entwickelnden Bewegungsmuskulatur. Hier wird der Differenzierungsprozess der Annelida beschrieben. Im Anschluss folgen vergleichende Beispiele anderer Invertebraten, nämlich dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* und den Larven des Arthropoden *Drosophila melanogaster*.

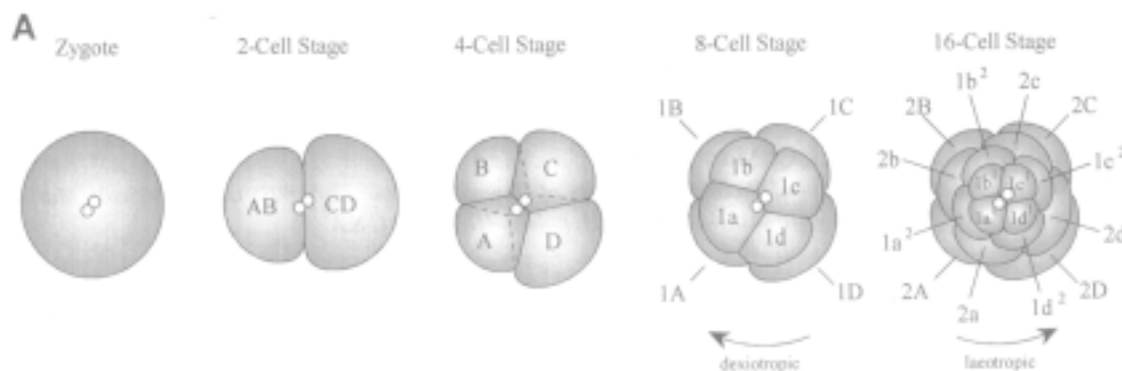


Abb. 2.2.: Spiralfurchung, inäquale Teilung (aus: Henry and Martindale, 1999). Erklärung siehe Text.

Die Anneliden gehören zu der Gruppe der Spiralfurcher, genauso wie die Mollusken, Plathelminthen, Nemertini, Sipunculiden und Kamptozoen. Als solche durchlaufen sie eine sogenannte Spiralfurchung, bei der es zunächst durch inäquale Teilungen der Zygote zu einem 4-Zell-Stadium kommt. Die D Zelle ist deutlich größer als die übrigen drei Zellen. In der nächsten Teilungsphase zum 8-Zell-Stadium verschiebt sich die Teilungsebene. Bei dieser Teilung wird die jeweils kleinere Zelle (Mikromere) an den animalen Pol abgegeben (Abb. 2.2.). Weitere Teilungen

folgen ebenfalls diesem Muster, so kommt es zur typischen Anordnung der Mikro- und Makromeren (Conklin, 1897). Aus der vergrößerten D-Zelle entsteht nach weiteren Teilungen die 4d-Zelle, von der sich das Mesoderm und somit die gesamte Bewegungsmuskulatur ableitet (Penners, 1924; Goto, 1999a). Die 4d-Zelle teilt sich bilateral in zwei gleich große Tochterzellen, den Mesoteloblasten. Zusammen mit den Ektoteloblasten führen sie eine teloblastische Sprossung durch (Abb. 2.3.). Die mesodermalen Bestandteile eines Segments werden so von je einer dieser entstandenen Blastzellen gebildet. Nach der Verschmelzung der beiden Keimstreifen durch epibolische Gastrulation bildet sich unterhalb des Ektoderms die einkernige Längs- und Ringmuskulatur.

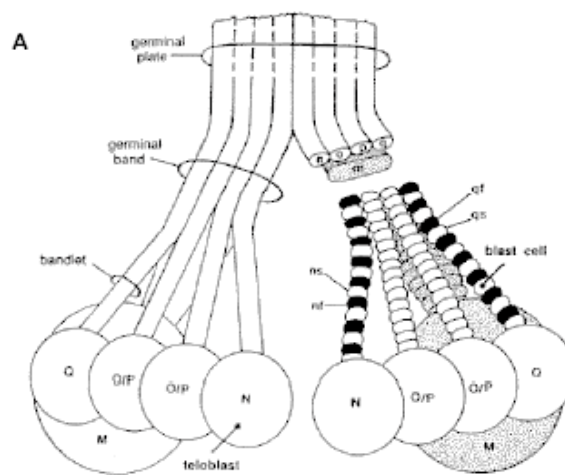


Abb. 2.3.: Sprossungszone eines Anneliden (*Hirudo medicinalis*) mit den Teloblasten M, N, O/P und Q (aus: Lans *et al.*, 1993).

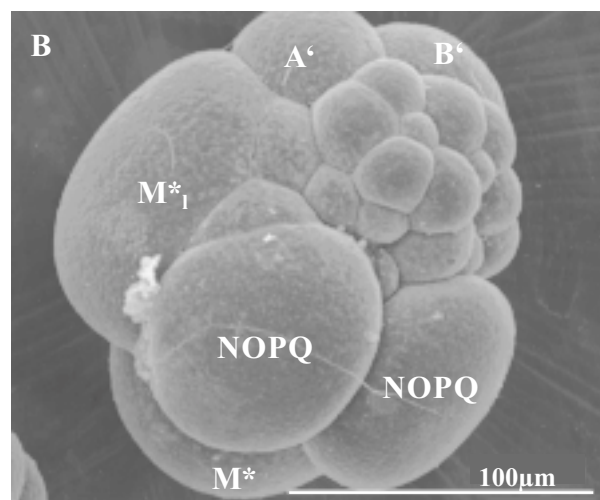
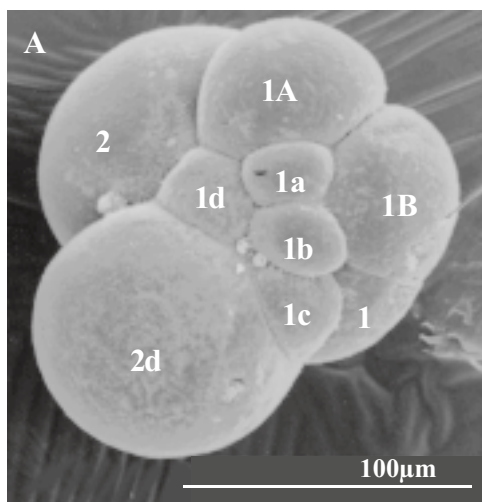


Abb. 2.4.: Frühe Embryogenese von *E. coronatus*. (A) 9-Zell Stadium, vom animalen Pol aus betrachtet. (B) Bildung der Mesoteloblasten. Ansicht von posterio-animal (aus: Bergter, 2001).

In bereits durchgeführten Arbeiten zur Embryonalentwicklung konnte gezeigt werden, dass sich frühe Embryonalstadien von *E. coronatus* entsprechend dem Schema der inäqualen Teilung verhalten (Bergter, 2001; Abb. 2.4.).

Die aus den Mesoteloblasten entstehende Bewegungsmuskulatur der Oligochaeten ist in einem Hautmuskelschlauch organisiert. Er besteht aus Ring- und Längsmuskulatur (Abb. 2.5.E). Nur bei hoch spezialisierten Arten, wie *Hirudo medicinalis* kommt noch eine dritte Schicht hinzu, die Diagonalmuskulatur (Jamieson, 1981; Jellies und Kristan, 1988). Die Muskelzellen sind einkernig. Als Antagonist der Bewegungsmuskulatur der Anneliden dient der Körperinnendruck der Coelomkammern. Die oben beschriebene Embryogenese der Oligochaeten wurde bereits detailliert an *Eisenia foetida* (Devries, 1968, 1971, 1973, 1985; Storey, 1989 a, 1989b), *Tubifex rivolorum* (Penners, 1922, 1924; Shimizu, 1982) und *Pachydrilus lineatus* (Penners, 1930) untersucht.

Im Gegensatz zu den Anneliden besitzt der Nematode *Caenorhabditis elegans* eine wesentlich ursprünglichere Muskulatur. Da er über eine ausgeprägte Zellkonstanz (Eutelie) verfügt, kann man den Zellstammbaum sehr gut verfolgen (Sulston *et al.*, 1983). Auch die Zygote von *C. elegans* teilt sich nach der Befruchtung asymmetrisch, es entsteht die sogenannte AB- und P1-Zelle. Aus der P1-Zelle entstehen schließlich nach einigen weiteren Zellteilungen die MS-Zelle, die C-Zelle und die D-Zelle. Fast alle Muskeln entstehen aus diesen 3 Zellen (Sulston *et al.*, 1983). Bei *C. elegans* sind die beiden Haupttypen von Muskelzellen die Längsmuskulatur des Hautmuskelschlauchs und einzelne Muskelzellen im Pharynxbereich (Epstein *et al.*, 1974). Von den 559 Zellen des Embryos sind 81 Muskelzellen des Hautmuskelschlauchs (Krause, 1995). Alle Muskelzellen bei *C. elegans* sind wie den bei Annelida einkernig und besitzen als Antagonisten lediglich den hydrostatischen Druck des Pseudocoels.

Bei *Drosophila* entsteht das mesodermale Keimblatt während der Gastrulation durch Invagination des ventralen Blastoderms (Thisse *et al.*, 1987, Crossley, 1987). Die Determination der Muskeln beginnt mit der Spezifizierung von Progenitoren aus dem Mesoderm (Bate, 1990; Rushton *et al.*, 1995). Durch asymmetrische Zellteilung entsteht aus den Progenitoren eine spezifische Anzahl an Muskelgründerzellen, eine für jeden Muskel pro Hemisegment des Embryos. Durch

Verschmelzung der Muskelgründerzellen mit fusionskompetenten Zellen entstehen mehrkernige Muskelvorläuferzellen (Rushton *et al.*, 1995). Insgesamt werden pro Hemisegment bis zu 30 Muskeln angelegt (Bate, 1993; Übersicht in Paululat *et al.*, 1999a; Paululat *et al.*, 1999b)

Die beiden oben beschriebenen Systeme gewähren einen Einblick in die Unterschiede der Differenzierung des Mesoderms innerhalb der Invertebraten. *C. elegans* dient hier als Beispiel für einen einfachen, ursprünglichen Organismus, während die Muskulatur von *D. melanogaster* durch ihren syncytialen Aufbau, die Anordnung in Sarkomeren und ihre Proteinzusammensetzung und ultrastrukturell schon der Vertebratenmuskulatur ähnelt (Bernstein *et al.*, 1993).

2.4. An der Mesodermdifferenzierung von Anneliden beteiligte Kandidatengene

Während der Embryonalentwicklung spielen verschiedene orthologe Gene wichtige Rollen bei der Differenzierung der einzelnen Gewebe. Auch bei Anneliden konnten bereits orthologe Gene isoliert werden. So wurden mehrere HOX-Gene isoliert und ihre Beteiligung an der Segmentierung untersucht. HOX-Gene wurden unter anderem bei *Chaetopterus* (Irvine and Martindale, 1999), *Helobdella* und *Hirudo* (Kourakis *et al.*, 1997; Nardelli-Haeffliger and Shankland, 1992; Wong *et al.*, 1995; Wysocka-Diller *et al.*, 1989) und *Stylaria* (Snow and Buss, 1994) gefunden. Es konnten mehrere Engrailed-Orthologe identifiziert und ihre Expression im Nervensystem, bzw. in den Teloblasten beschrieben werden (Bely and Wray, 2001; Seaver *et al.*, 2001; Wedeen and Weisblat, 1991). Weitere Gene, die ebenfalls in Anneliden gefunden werden konnten, sind *nanos* (Pilon and Weisblat, 1997), *ets* (Bocquet-Muchembled *et al.*, 2001), *wnt* (Kostriken and Weisblat, 1992) und *alpha-tubulin* (Fedorov *et al.*, 1999). Es konnten auch schon Gene gefunden werden, deren Orthologe in anderen Spezies an der Differenzierung des Mesoderms beteiligt sind, nämlich *dorsal* und *snail* bei *Helobdella* (Goldstein *et al.*, 2001). Auf folgende Familien wird ein besonderer Fokus gelegt, da sie besonders interessante Einblicke in die Differenzierung des Mesoderms bei Anneliden versprechen.

a) Die *twist*-Familie

Ein Gen, das bereits in vielen Organismen nachgewiesen wurde, ist *twist*. Dieses Gen gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, der sogenannten bHLH-Familie. Die „*basic-helix-loop-helix*“-Domäne ist ein DNA-Bindemotiv (basischer Teil) und zeigt sich auch für die Dimerisierung der Proteine (HLH-Domäne) verantwortlich (Olson und Klein, 1994). Innerhalb dieser Domäne besitzen die Proteine eine Übereinstimmung auf Aminosäuresequenzebene von über 80 %. Andere orthologe Gene der bHLH-Familie, die an der Myogenese beteiligt sind, wie zum Beispiel *myoD* (Hopwood *et al.*, 1989) und *hand* (Natarajan *et al.*, 2001) zeigen beim zwischenartlichen Vergleich ebenfalls hohe Sequenzübereinstimmungen (Olson und Klein, 1994). Die *twist*-Familie wird von den anderen bHLH-Proteinen separiert, da die bHLH-Domäne der Twist-Proteine extrem konserviert ist.

In Anneliden war es möglich, ein *twist*-orthologes Fragment aus dem Blutegel *Helobdella robusta* zu isolieren (Soto *et al.*, 1997). Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen cDNA-Bibliotheken und PCR-Techniken konnten wir aus *E. coronatus* ebenfalls ein Twist-Ortholog klonieren (Paululat, pers. Mitteilungen).

Orthologe von *twist* konnten unter anderem bei *Caenorhabditis* (Harfe und Fire, 1996), *Drosophila* (Thisse *et al.*, 1987; Bate, 1993), *Tribolium* (Sommer and Tautz, 1994), *Xenopus* (Hopwood *et al.*, 1989), *M. musculus* (Wolf *et al.*, 1991) und *H. sapiens* (Wang *et al.*, 1997) isoliert werden.

Twist wird sowohl bei *Drosophila* als auch bei *C. elegans* schon früh in der Embryogenese exprimiert. Alle mesodermalen Zellen bei *D. melanogaster* exprimieren *twist* (Thisse *et al.*, 1988). Bei *C. elegans* kann man das Twist-Ortholog *hlh-8* ebenfalls in mesodermalen Zellen nachweisen (Harfe und Fire, 1996). *Twist*-Mutanten in *Drosophila* bilden keine mesodermalen Strukturen aus (Leptin, 1991). Fehlende *hlh-8* Expression in *C. elegans* führt zur Veränderung des Zellschicksals einiger Zelllinien, die Muskulatur hingegen entwickelt sich normal (Harfe *et al.*, 1998). So kann man postulieren, dass *twist* bei *C. elegans* nicht die Bedeutung besitzt, die es bei höher entwickelten Spezies einnimmt (Baylies and Michelson, 2001). Hier stellt sich die Frage nach dem Funktionswandel dieser Gene während der Evolution (siehe Fragestellung).

b) Die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie

Eine weitere Familie, die an der Mesoderm differenzierung beteiligt ist, sind die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR). Sie gehören zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Für alle FGFRs ist charakteristisch, dass sie über eine hochkonservierte Tyrosinkinase-Domäne am C-Terminus verfügen. Zudem besitzen sie eine Transmembran-Domäne und 2 bis 5 Immunglobulin-Domänen im N-terminalen Bereich (Abb. 4.12.).

Auch von dieser Genfamilie konnten Orthologe aus verschiedenen Spezies isoliert werden, zum Beispiel aus *Drosophila* (Gisselbrecht *et al.*, 1996; Shishido *et al.*, 1993), *C. elegans* (Stern *et al.*, 1991), *H. sapiens* (DeBoer *et al.*, 1997) und *Hydra vulgaris* (Reidling *et al.*, 2000; Stover and Steele, 2001). Bei fast allen Spezies spielen sie eine Rolle bei der Differenzierung des Mesoderms und sind für Zellmigrationen verantwortlich. Einer der beiden Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR), die bei *Drosophila* vorkommen, wird durch das *heartless*-Gen kodiert. Er ist an der Migration von Mesodermzellen beteiligt. Außerdem spielt er eine Rolle bei der Bildung des Herzens im Embryo (Beiman *et al.*, 1996). Der zweite FGFR wird durch *breathless* kodiert und ist verantwortlich für die Migration von Tracheenzellen (Glazer and Shilo, 1991; Klämbt *et al.*, 1992).

Auch der bei *C. elegans* vorkommende FGFR ist für Zellmigrationen verantwortlich. Das Gen *egl-15* kodiert für ein Protein, dass die Geschlechts-Myoblasten veranlasst, sich rund um die Gonade anzusiedeln (DeVore *et al.*, 1995).

2.5. Die Eigenschaften einer embryonalen cDNA-Bibliothek

Um einen Organismus molekularbiologisch zugänglich zu machen, ist die Etablierung bestimmter Techniken notwendig. In vorhergehenden und der vorliegenden Arbeit gelang es, folgende Standardtechniken an *Enchytraeus coronatus* zu etablieren: Die Präparation von genomischer DNA, die Isolierung von Gesamt-RNA und Poly-A-mRNA aus verschiedenen Stadien, PCR- und RT-PCR Techniken, Isolierung einzelner cDNA-Fragmente über PCR (Brand, 1999) und die Herstellung einer genomischen Bibliothek (Mavridou, 2001).

Die bereits hergestellte genomische Bibliothek bietet mehrere Perspektiven: Sie hat den Vorteil, dass man Aussagen über die Exon/Intron-Struktur eines Gens treffen kann. Weiterhin ist es möglich, regulatorische Bereiche des Gens zu isolieren, wie zum Beispiel den Promotorbereich. Allerdings hat man keine Möglichkeit, etwas über den Expressionszeitraum des Gens herauszufinden. Zu welchem Zeitpunkt innerhalb der Entwicklung ein Gen exprimiert wird, liefert wichtige Informationen bei der Frage nach der Funktion des Gens. Das ist ein entscheidender Vorteil, den die Herstellung einer cDNA-Bibliothek bietet. Stadienspezifische cDNA-Bibliotheken beinhalten alle exprimierten Gene eines bestimmten Zeitfensters. Dieses legt man fest, indem man nur Entwicklungsstadien verwendet, die für die Fragestellung relevant sind. Aus diesen Stadien isoliert man Poly-A-mRNA. Alle Gene, die in diesem Zeitraum aktiv sind und exprimiert werden, sollten in dem Pool von mRNAs vorhanden sein. Natürlich sind die Häufigkeiten der vorkommenden mRNAs nicht gleich, da je nach Entwicklungsphase manche Gene stärker exprimiert werden als andere. Bestimmte Gene, die nicht in der Embryogenese exprimiert werden, sollten überhaupt nicht repräsentiert werden, oder nur als maternale Komponente. Es ist möglich, cDNA-Bibliotheken aus einzelnen Geweben herzustellen, um die Funktionsweisen bestimmter Gene weiter einzugrenzen (Shepard and Rae, 1998). Mittlerweile ist es schon gelungen, cDNA-Bibliotheken aus einzelnen Zellen herzustellen, zum Beispiel aus Mauszygoten (Brady and Iscove, 1993; McCarrey and Williams, 1994).

Ein weiterer Vorteil solch einer Bibliothek ist die Größe der Fragmente. Bei einer genomischen Bibliothek werden Fragmente, die oft größer als 40 kb sind, in Vektoren kloniert. Hat man einen Klon isoliert, der ein Fragment des gesuchten Gens beinhaltet, müssen noch weitere Schritte unternommen werden, bis die eigentliche Sequenz analysiert werden kann. Aufgrund großer Introns kann sich ein Gen über viele Kilobasen erstrecken, und es ist oft schwierig, das komplette Gen zu überschauen bzw. zu identifizieren. Bei einer cDNA-Bibliothek kloniert man Fragmente mit einer Größe von 500 Basenpaaren bis 6 Kilobasenpaaren. Diese Fragmente enthalten kodierende Sequenz ohne Intronstrukturen, da sie auf umgeschriebener Poly-A-mRNA basieren. Es ist möglich, cDNAs zu isolieren, die dem kompletten Transkript entsprechen.

2.6. Fragestellung und Zielsetzung

Ausgangspunkt der Arbeit ist die Frage nach der Evolution entwicklungsbiologischer Prozesse, im speziellen der Differenzierung des Mesoderms und seiner Derivate. Bisher gut untersuchte Modelle, wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* dienen als Basis für die Planung des Projekts.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung einer embryonalen cDNA-Bibliothek aus dem Anneliden *Enchytraeus coronatus*. Durch Durchmustern dieser Bibliothek sollte versucht werden, einen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) zu isolieren. Zur Vervollständigung der Fragmente sollten RT-PCR und RACE-PCR Techniken standardisiert werden, um fehlende 5'-Bereiche der zu untersuchenden Gene zu amplifizieren.

Weiterhin sollten mit Hilfe von Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierungen erste Versuche zu Expressionsanalysen durchgeführt werden. Dies sollte sowohl an ganzen Embryonen (whole mount), als auch an Schnittpräparaten erfolgen.

3. Material und Methoden

I. Material

3.1. Geräte

Blotting Apparatur	Biometra, Göttingen
Gelkammern	Werkstatt Universität Marburg, Biometra, Göttingen
Elektrophorese-Spannungsquellen	BioRad Power Pack 3000 Pharmacia ECPS 3000/150
Entwicklermaschine	AGFA Curix 60
Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Fotomikroskop	Axiophot, Zeiss
Heizblock	LB1210, Berthold
Histoblöcke	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Konvokales Laser-Scan-Mikroskop	TC SSP2, Leica
Kryobad	Julabo F10, Seelbach
Kryotom	CM 3050, Leica
Kühlzentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R
Magnet-Kochrührer	Heidolph MR 2002
Mikroskop	M 3 Wild, Heerbrugg Olympus BX 41 XVI 45, Leitz
Mikrotom	Amersham, Braunschweig
Nylonmembran (Hybond N)	Biometra, Göttingen
PCR-Maschinen	MiniCycler PTC-150, MJ Research MultiCycler PTC-200, MJ Research
Photometer	Gene-Quant RNA-DNA Calculator,

Potter Homogenisator	Pharmacia
Probenschüttler	Potter S, B. Braun
Stereomikroskop	Rundschüttler GFL 3005
Trio-Thermoblock	Nikon Typ 102
Tischzentrifugen	Biometra, Göttingen
	Eppendorf Centrifuge 5415 C
	Biofuge 13, Haereus
UV-Crosslinker	UV Stratalinker, Stratagene
Vakuumzentrifuge	Savant SVC 100 H
Vortexer	Vortex Genie 2, MAGV, Rabenau, Londorf
Wärmewasserbad	Julabo U3

3.2. Chemikalien

Agar	Difco, Eggenstein
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
	Biometra, Göttingen
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer, Mannheim
Ampicillin	Fluka, Neu-Ulm
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Alkoxysilan (Bindsilan)	Wacker, München
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D- thiogalactosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Fluka, Neu-Ulm
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Casitone	Difco, Eggenstein
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt

Chloroform	Merck, Darmstadt
3,3' Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Fluka, Neu-Ulm
Dichlordimethylsilan	Sigma, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merk, Darmstadt
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethyldiaminotetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycogen	Fluka, Neu-Ulm
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Heptan	Fluka, Neu-Ulm
Hoechst 33258	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck-Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe

Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
4-Nitrotetrazoliumchlorid (NBT)	Boehringer, Mannheim
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Octylphenolethylenglycolether (Triton-X-100)	Serva, Heidelberg
Piperazin-N,N' - bis (2-ethanolsulfonsäure) (Pipes)	Sigma, Deisenhofen
Phalloidin	Sigma, Deisenhofen
Phenol (TE-gesättigt)	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen
Propionsäure	Sigma, Deisenhofen
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Sigma, Deisenhofen
1,1,1, - Trichlormethan	Merck, Darmstadt
Technovit 3040	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Tissue Tek	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Tryptone	Difco, Eggenstein
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

3.3. Radioisotope

(α - ³² P)-dATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
---	------------------------

3.4. Enzyme

MMLV Reverse Transkriptase	LifeTechnologie, Schottland
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
	Amersham, Braunschweig
SP6 RNA Polymerase	Boehringer, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Sigma, Deisenhofen
T4 DNA Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4 DNA Ligase	Boehringer, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Boehringer, Mannheim

3.5. Fertige Reagenziensätze

AdvanTAge PCR-Cloning Kit	Clontech, Palo Alto, USA
Jetsorb-DNA-Extraktionskit	GENOMED, Bad Oeynhausen
Jetstar Extraktionskit für Midi- und Maxi-DNA-Präparationen	GENOMED, Bad Oeynhausen
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
Zero Blunt PCR Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
GFX-PCR, DNA and Gel Band Purification Kit	Pharmacia, Freiburg
T7- Sequencing Kit	Pharmacia, Freiburg
Vectastain ABC Elite Kit PK-6100	Camon, Wiesbaden
SMART RACE cDNA Amplification Kit	Clontech, Palo Alto, USA

SMART cDNA Library Construction Kit	Clontech, Palo Alto, USA
Gigapack III Packaging Extract	Stratagene, La Jolla, USA
Prime it – Random Primer Labeling Kit	Stratagene, La Jolla, USA
λ -Zap cDNA Library Synthesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
RNA-Clean Isolierungs Kit	AGS, Heidelberg
PolyAtract mRNA Isolierungs Kit	Promega, Madison, USA
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden

3.5.1. DNA/RNA-Marker

Standardisierte Marker-DNA oder -RNA wird bei der Gelelektrophorese eingesetzt, um die Größe von Fragmenten zu bestimmen.

λ -DNA <i>Eco RI/Hind III</i> (21 kb – 125 bp)	Boehringer, Mannheim
Mass Ruler DNA-Ladder, Mix (10 kb – 80 bp)	MBI Fermentas,
Low Ladder Marker (1 kb-100 bp)	Sigma, Deisenhofen
RNA-Ladder Mix	MBI Fermentas

3.6. Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden zur spezifischen Amplifikation verschiedener DNA-Sequenzen durch PCR benutzt, aber auch in Sequenzierungsanalysen eingesetzt.

Dtwi 1199-1220 Fw	TGAAGCGGAAGCCCAGCAAGAC
Dtwi 1599-1578 Rv	GCGCCACACCCCGAACAGATAA
Dmef 469-490 Fw	CAGCCGAGCCGAGCACAAGGA
Dmef 1004-987 Rv	CGGCACCGGAACAGAAAC
DFR1 1184-1204 Fw	ATGATTATGCCGGTGGTTAGG
DFR1 2200-2182	CGTCGAGGGCGGCGTATC

RTK2 Klon 19 FW1	CCCCAGGACTGCACAACGGCGATT
RTK2 Klon 19 RV1	AATCCGCAATATAACATCAGCCTCAAT
RTK2 Klon 4.2 FW1	AAAAACAGACACAAATACATACACAATC
RTK2 Klon 4.2. RV1	GATGTCATCAACGGACCACTCTGC
RTK2 Klon 19 Fw2	GCTGGTGC GGCGAGTTCAAAGATT
RTK2 Klon 19 Rv2	ATGGAATTGATTGGCACTCGGTAG
RTK1 Klon 16 Rv1	TAGGCCTACTATAACAATTATTCATA
RTK1 Klon 16 Fw1	TAGTGTTTCTTCTTATTTATGGTTTTTAGG
RTK1 Klon 17.1 Fw1	CCGGACAACAGAGGACGAGGATAAGC
RTK1 Klon 17.1 Rv1	GAGATTAGCCTGTTATCCCT
RTK1 Klon 17.2 Fw1	CCATTAGAGGGTCAGCAGAAGATTT
RTK2 19.1 Rv6	CTGACGTCCCGCCCCCTGGTG
RTK2 19.1 Rv7	GCACCAGCACGGCCCCACAGC
RTK2 19.1 Rv8	CGGTACACAGCCACGCCCCACTG
RTK1 Fw 4	AGGCCAGGCAGTGGAGGTACTTCGA
RTK1 Fw 5	CTGCTGGTGGGGGAGGTGGTG
RTK1 Rv 13	TTCAGATAAAGTCTGCAGTGAGGCACTATGGA- CCATTC
RTK1 Rv 14	CTTTGATTTTTCGCAAGTCCCCCCCCCCCCA
RTK1 Fw 8	TTCACCAACAGCAGGAGACTAAAATAAAG
RTK1 Rv 11	TGTAAGTGCTTGTGGCCTCTATTCATT
RTK1 Rv 12	TCCTGTACTCGCATATTAGATCGGCATTTG
RTK1 Fw 7	ACGCGGGGAATGAATAGAGGCCACAAGC
RTK1 Rv 5	CATATAAATTAAAATTCAGATAAAGTCTGCAG- TGAGG
RTK1 Rv 6	CCCCCACTCGATGCTGTTA
RTK1 Rv 7	TAACGTCGAAGTACCTCCACTGCCTG
RTK1 Rv 8	ACCTCACCACCTCCCCCACCAG
RTK1 Fw 6	AGAGAAGGAGGTGGAATATTTTGTAGAGG
RTK1 Rv 9	TCCATTCTTGATCCAGGTAACATTCC
RTK1 Rv 10	CCTCTACAAAATATTCCACCTCCTTCTCT

OLIGO d(T)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT
FGFR2 FW2	ATAGCACGTGAGGTATGGAATCTT
FGFR2 FW4	CTCTGGCTGGCTAGGCTACTTTTCTC
FGFR2 RV4	GGTGTGCCTGGGTATGGGTTAGC
FGFR2 FW1	ACCAGTCGCTTCCTTCTCCACATCCAG
FGFR2 FW5	AGGGACCTGGCAGCAAGAAACATACT
FGFR2 RV5	TGCAGGATCTTCATGTCACTCAGGTAT
E. coro DRF1 Rv4	CCGGCGCCATCCACTTCACG
RTK1 1st Str.	ATTGCTGCTGTTGC
RTK2 DIG	GGAGGAGTTAAAGAGTGATTCCATGGTAACC- ACGCAGGA-DIG
RTK2 1st Str.	CGGGTCTTTCATTAG
E. coro DRF1 Rv1	GATCATCCTTCCAGCACCACA
E. coro DRF1 Fw1	CGTGATTTGTCGCTGTTGATGC
E. coro DRF1 Rv3	TCTTTCTCGGCCCATAGCAATCAT
E. coro DRF1 Fw2	AGGTAAGGTGCTAGGAGAAGGAG
E. coro DRF1 Rv2	AAGGTTTGCCATGTCACTGTCC
E. coro DRF1 Fw3	CGCCTGCCCCGTGAAGTGGATG
E. Sox Fw II	AGCGTCAGTCCCGTTACAGCGTTAGAAGAG
E. Sox Rv II	ATTTGCAGCCGTGGTGTGAGATGGTTT
E. Sox Fw I	TGCAGGCAGGGGCGGTGATTATGTTAC
E. Sox Rv I	TGGACGTTTGATGTGGTTGGCTGACTTTTT
T3	GGAAACAGCTATGACCATG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 rv	GGAAACAGCTATGACCATG
UPS	Mix aus den Primern Long (0,2 µM) und Short (1 µM)
Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG- TAACAACGCAGAGT
Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nup	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT

Test in T70	AGGGCGATGGCCCACTACGTG
Test in T30	GCCTATGGAAAAACGCCAGCA
SMART II	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG
3'-CDS	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ N ₋₁ N (N = A, G, C oder T; N ₋₁ = A, G, oder C)
5'-CDS	(T) ₂₅ N ₋₁ N

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

3.7. Plasmide

pBluescript II	Klonierungsvektor mit multipler Klonierungsstelle, Stratagene, La Jolla, USA
pCR-Script Amp SK(+)	abgewandelter Bluescript-Vektor mit <i>Srf</i> -Schnittstelle, Stratagene, La Jolla, USA
pCR II-TOPO	abgewandelter Bluescript-Vektor mit TOPO-Klonierungsstelle, für die direkte Ligation von PCR-Produkten ohne vorherige Aufreinigung, InvitroGen, Groningen, NL
pCR-Blunt	abgewandelter Bluescript-Vektor für die direkte Ligation von PCR-Produkten ohne Überhang (blunt), InvitroGen, Groningen, NL
pCR-Blunt II-TOPO	abgewandelter Bluescript-Vektor mit TOPO-Klonierungsstelle, für die direkte Ligation von PCR-Produkten ohne Überhang, InvitroGen, Groningen, NL
pTriplEx II	Plasmid-Vektor aus der in vivo Excision des Phagen λ TriplExII, Clontech, Palo Alto, USA

3.8. Stammhaltung und Kultivierung von Bakterienstämmen

a) Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

DH5 α *supE44, Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*

XL-1 Blue *supE44, hsdR17, endA1, recA1, endA1, gyrA46, thi-1, relA1, lac⁻, F'[proABlac^I, lacZ Δ M15, Tn10(tet^R)]*

Beide Stämme wurden für die Transformation mit rekombinanten Plasmiden eingesetzt.

BM25.8 *supE44, thi Δ (lac-proAB) [F'traD36, proAB⁺, lac^qZ Δ M15] λ imm434 (kan^R) P1(cam^R) hsdR (r_{k12}⁻m_{k12}⁻)*

Dieser Stamm wurde für die in-vivo Excision des Phagen λ benutzt.

b) Kultivierung und Stammhaltung

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

1 % (w/v) Bacto-Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

85,5 mM NaCl

Für die Anzucht der Bakterien in Flüssigkulturen wurde LB-Medium verwendet. Kurzfristige Stammhaltungen erfolgten auf festen Agarnährböden (LB-Medium/1,5 % Agar), die nach der Anzucht bei 37 °C schließlich für einige Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden konnten. Zur langfristigen Stammhaltung wurde eine frische Flüssigkultur mit 15 % sterilem Glycerin gemischt und bei –80 °C aufbewahrt.

3.9. Antikörper und Seren

anti-Tubulin (acetyliert) (monoklonaler AK aus Maus)

Sigma, Deisenhofen

anti-phospho-Histon PH3

Sigma, Deisenhofen

anti-engrailed 4D9 (monoklonaler AK aus Maus)

Hybridoma, Iowa USA

anti-mef2 (monoklonaler AK aus Kaninchen)	freundlicherweise überlassen von Hanh Ngyen, New York
anti-Maus IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame
anti-Maus IgG, alkalische Phosphatase gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingame
anti-Kaninchen IgG, alkalische Phosphatase gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingame
Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame

II. Methoden

3.10. Stammhaltung von *Enchytraeus coronatus*

(nach Albert, 1975)

Knopflösung	5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
	1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	2 mM KH_2PO_4
	2,5 mM KNO_3
	2 mM KCl
	0,1 mM $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

Die ersten Zuchtplatten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Seitz (im Hause) zur Verfügung gestellt. Die beste Zuchtmethode für die beabsichtigten Versuche war die Haltung der Tiere in Petrischalen mit 2 %igem Bodenextraktagar in Knopflösung. Auf diese Weise gab es keine störenden Bodenverunreinigungen beim Extrahieren der Würmer. Als Nahrungsmittel wurden Haferflocken verwendet. Diese wurden einmal wöchentlich dünn auf die Platten ausgestreut. Die Zucht der Tiere fand bei 18 °C im Kulturraum statt.

Zuchtmethoden, die sich durch die Haltung auf Filterpapier (Trappmann, 1953; Learner, 1972) als sehr sauber auswiesen, brachten keine große Ausbeute an Oligochaeten.

Die Agarplatten wurden regelmäßig beobachtet und auf Schimmel oder Milbenbefall untersucht. Zur Weiterzucht wurden adulte Enchytraeen von älteren Petrischalen mit einem Spatel oder einer

Pasteur-Pipette abgesammelt. Die abgesammelten Anneliden wurden in Leitungswasser von Agarresten befreit und mit einer Pipette auf frische Schalen überführt.

3.11. Sammeln von Kokons

PBS	140 mM NaCl ₂
	6,5 mM KCl ₂
	2,5 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,5
	autoklavieren

Die Kokons wurden mit einem Spatel von der Oberfläche der Petrischalen abgekratzt und in 0,7 %iges NaCl oder PBS überführt. Im jeweiligen Medium wurden sie mehrmals gewaschen, bis sie vollständig von Rückständen befreit waren. Das Waschen erfolgte unter druckvollem Spülen mit einer Pasteur-Pipette im Blockschälchen.

3.12. Fixierung und Präparation von Kokons

Die Kokons wurden mit einer Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das PBS wurde abgezogen und 4 % Paraformaldehydlösung dazugegeben. Die Fixierung erfolgte durch leichtes Schwenken über Nacht bei 4 °C auf einem Probenschüttler. Danach wurde das Paraformaldehyd abgezogen und die Kokons 10 Minuten mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Kokons in ein Blockschälchen transferiert.

Mit Hilfe zweier Einwegspritzen und Kanülen (0,4 mal 20 mm) als Werkzeug wurden die Kokons aufpräpariert. Die herausgelösten Embryonen konnten sofort zur Weiterbearbeitung verwendet werden.

Für eine dauerhafte Aufbewahrung wurden die Embryonen nach zweimaligem Waschen für 10 min in MeOH bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in MeOH gelagert.

3.13. Herstellung von Schnittpräparaten

a) Paraffin-Schnitte

Fixierte und in Methanol gelagerte Adulte oder Embryonen wurden anhand folgender Reihe in Paraffin überführt:

5 min 100 % Ethanol
5 min 50 % Ethanol/Toluol
5 min 100 % Toluol
5 min 50 % Toluol/Paraffin $60\text{ }^{\circ}\text{C}$
2 min 100 % Paraffin $60\text{ }^{\circ}\text{C}$
2 min 100 % Paraffin $60\text{ }^{\circ}\text{C}$
2 min 100 % Paraffin $60\text{ }^{\circ}\text{C}$

Dabei wurde das Paraffin im Wärmeschrank bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ flüssig gehalten. Mit Hilfe einer umgedrehten Glas-Pasteurpipette, die bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde, wurde das Paraffin mit den Embryonen in vorgefertigte Formen getropft und ausgehärtet. Die ausgehärteten Blöckchen wurden mit Technovit 3040 auf Trägerblöcke geklebt. Die Trägerblöcke wurden in das Mikrotom eingespannt und Schnittpräparate in einer Stärke von $5\text{--}8\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt. Diese wurden zum Strecken mit einem Pinsel in ein 40°C Wasserbad überführt und schließlich mehrere Schnitte auf einem Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden in Küvetten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Entparaffinierung wurde in einer Küvette durchgeführt:

3x 10 min 100 % Toluol
3x 5 min 100 % Isopropanol
5 min 96 % Isopropanol/PBS
5 min 90 % Isopropanol/PBS

5 min 75 % Isopropanol/PBS

5 min 50 % Isopropanol/PBS

5 min 100 % PBS

b) Kryoschnitte

Frisch fixierte Embryonen wurden in Tissue Tek eingebettet und im Kryotom festgeklebt. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 15 µm angefertigt und auf SuperFrost Objektträger aufgezogen. Diese wurden in einer Küvette bei –70 °C aufbewahrt.

3.14. DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258

a) ganze Embryonen

Ca. 50 fixierte *Enchytraeen* (Adulte oder Embryonen) wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl PBS überführt. In MeOH gelagerte Anneliden wurden zuvor zweimal 10 min in PBS rehydriert.

Das PBS wurde abgezogen und 500 µl Hoechst (2 µg/ml) dazugegeben. Die Färbung erfolgte im Dunkeln für 5 min unter leichtem Schwenken.

Nach zweimal 10 minütigem Waschen in PBS erfolgte die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

b) Paraffin-Schnittpräparate

Die Schnitte wurden in einer Küvette über eine Toluol-Alkohol-Reihe (siehe 3.12.) in PBS überführt. Auf die Schnitte wurden 40 µl PBS/Hoechst (2µg/ml) gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser entfernt und die Schnitte nach zweimal 10 minütigem Waschen in PBS unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.15. Aktinfärbungen mit Phalloidin

Das Phalloidin (1 mg/ml) wurde in gebrauchsfertige Portionen zu je 10 µl eingeteilt und diese im Dunkeln bei –20 °C aufbewahrt, da Phalloidin äußerst lichtempfindlich ist.

Vor Gebrauch wurde eine Probe in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Pellet wurde in 500 µl PBS gelöst.

Danach wurde von den sich in PBS befindlichen Embryonen das PBS abgezogen und die Phalloidinlösung hinzugefügt. Nach 10 minütiger Inkubation unter leichtem Schwenken wurde das Phalloidin abgezogen und die Embryonen in PBS gewaschen.

Die Embryonen wurden in Glyzerin eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.16. Isolierung genomischer DNA aus *Enchytraeus coronatus*

(modifiziert nach einer bei *Drosophila* etablierten Methode von Steller und Pirotta, 1986)

Extraktionspuffer	100 mM Tris/HCl (pH 9,0)
	100 mM EDTA
	1 % (w/v) SDS

Ca. 40 adulte Würmer wurden mit Hilfe eines Pistills in 100 µl Extraktionspuffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß homogenisiert und danach 20 min bei 65 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl 8 M KAc und 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer in einer Kühltzentrifuge abzentrifugiert (13 000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und die darin enthaltende DNA mit 0,5 VT Isopropanol auf Eis für 45 min gefällt.

Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) und mehrmaligem Waschen mit kaltem, 70 %igen Ethanol wurde das Präzipitat ca. 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde die genomische DNA in 20-100 µl destilliertem Wasser gelöst.

3.17. Präparation von RNA aus *Enchytraeus coronatus*

a) Gesamt-RNA-Präparation

Die Präparation von Gesamt-RNA wurde nach der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode durchgeführt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Reagenzien wurden in Form eines Reagenziensatzes in gebrauchsfertiger Form bereitgestellt (RNA-Clean-System, AGS, Heidelberg).

Kokons oder adulte Würmer wurden in 0,7 %igem NaCl gesammelt und mehrmals gewaschen, um Verunreinigungen, wie zum Beispiel Milben, zu vermeiden. In flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe schockgefroren und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Das zu bearbeitende Gewebe wurde in RNA-Clean (2 ml pro 100 mg Gewebe) mit einem Handpotter homogenisiert. Dazu wurde 0,1 Volumenteil Chloroform gegeben, 15 sec stark geschüttelt und schließlich 5 min auf Eis stengelassen. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm trennten sich zwei Phasen. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und ein gleicher Volumenanteil Isopropanol hinzugefügt. Nach Durchmischen wurde das Reaktionsgefäß 15 min auf Eis gestellt und anschließend wieder bei 12000 rpm 15 min zentrifugiert.

Das gewonnene Pellet wurde einmal mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und 8 min bei 7500 rpm zentrifugiert.

Zum Schluß wurde das Pellet in destilliertem RNase freien Wasser gelöst, eventuell bei 50 °C, da es oft schwer löslich war.

b) Poly-A-mRNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von Poly-A-mRNA wurde das PolyAtract-mRNA-Isolierungs-Kit der Firma Promega benutzt. 0,1 – 1 mg Gesamt-RNA wurden in 500 µl Wasser aufgenommen und in einem Wasserbad bei 65 °C 10 min inkubiert. 3 µl biotylinierte Oligo(dT) Nukleotide und 13 µl 20x SSC wurden der Lösung zugefügt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit gewaschenen Streptavidin-Magnetkügelchen

überführt und für 10 min inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,1x SSC wurde die mRNA mit 250 µl RNase freiem Wasser von den Magnetkügelchen abgelöst.

3.18. Polymerasekettenreaktion („PCR“)


(Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerasekettenreaktion, abgekürzt PCR (*polymerase chain reaction*), ist eine Methode, die die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte ermöglicht. Die Voraussetzung für eine gezielte Anreicherung eines DNA-Abschnittes ist die Kenntnis flankierender Sequenzbereiche. Diese Bereiche dienen der Anlagerung synthetisch hergestellter Oligonukleotide, die der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase ein freies 3'OH Ende anbieten, an dem die DNA Elongation startet. Durch zyklische Wiederholungen des Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Polymerisierungsschrittes wird eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erzielt.

Die Reaktionsansätze umfaßten ein Volumen von 50 µl und setzten sich folgendermaßen zusammen:

X µl Template-DNA (1–200 ng)
1 µl Sinn Oligonukleotide (0,01 pmol/µl-100 pmol/µl)
1 µl Antisinn Oligonukleotide (0,01 pmol/µl-100 pmol/µl)
2 µl dNTP (2,5 mM pro dNTP)
1-3 µl Magnesiumchlorid (10 mM)
5 µl 10x PCR Puffer
0,2-1 µl *Taq*-DNA-Polymerase

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermoblock nach folgendem Basisprogramm durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	120 sec	 25 - 35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Hybridisierung	55 °C	45 sec	
Polymerisierung	72 °C	60 sec	
Polymerisierung	72 °C	300 sec	
Abbruch	8 °C	∞	

Die Reaktionsprodukte wurden schließlich in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.13.).

3.18.1. RT-PCR („Reverse Transkription“-PCR)

RT-PCR ist die empfindlichste Technik, um die Gegenwart oder Abwesenheit von RNA-Molekülen zu bestimmen. Außerdem ermöglicht RT-PCR die Klonierung von seltenen Transkripten ohne die Notwendigkeit, eine cDNA Bibliothek zu konstruieren.

Man unterscheidet zwei Varianten der RT-PCR-Technik:

1. Die 2-Schritt-Methode

Die cDNA Synthese wird mit Reverser Transkriptase in einem ersten Schritt durchgeführt. Anschließend wird durch Zugabe einer entsprechenden thermostabilen Polymerase die entstandene cDNA amplifiziert.

2. Die 1-Schritt-Methode

cDNA Synthese und PCR werden in einem optimierten Puffer und mit einem entsprechenden Enzym zwar nacheinander, aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien durchgeführt.

Die Zweischritt-Methode hat den Vorteil, daß man zuerst cDNA herstellt und dann noch in der eigentlichen PCR variieren kann. Dafür muß man das Reaktionsgefäß öffnen und entsprechende

Reagenzien hinzugeben. Die hierbei auftretenden Fehlerquellen werden durch die Einschritt-Methode vermieden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden verwendet.

3.18.2. Touchdown PCR

Die Touchdown-PCR ist eine Methode, um die Spezifität der PCR zu erhöhen. Hierbei werden erst einige Zyklen durchlaufen, bei denen die Hybridisierungstemperatur höher liegt, als die Schmelztemperatur der Oligonukleotide. Dadurch wird in der Regel das Hybridisieren der Oligonukleotide mit sich selbst und an unspezifische Sequenzen vermieden. Die Touchdown-PCR ist meistens noch mit Hot Start PCR kombiniert, die auf der Verwendung einer Antikörper gekoppelten *Taq*-DNA-Polymerase beruht. Erst bei entsprechender Temperatur, die je nach Antikörper zwischen 60 und 70 °C liegt, löst sich der Antikörper und die Polymerase wird aktiv.

3.18.3. RACE-PCR („rapid amplification of cDNA ends“)

Bei dieser PCR-Methode wird versucht die 5'- bzw. 3'- Bereiche eines Gens zu amplifizieren. Beim 3'-RACE macht man sich zunutze, daß die cDNA am 3'-Ende eine Poly-T-Sequenz trägt. Mit einem internen Oligonukleotid aus einer bekannten Sequenz des Gens und einem Poly-T-Oligonukleotid wird nun das 3'-Ende amplifiziert. Bei einer 5'-RACE muss an das 5'-Ende der cDNA noch eine bekannte Sequenz fusioniert werden, ein sogenannter Adapter. Bei den in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenziensätzen (Marathon-cDNA-Amplification Kit, SMART RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, USA) wurden in einer Reaktion sowohl an das 5'- als auch an das 3'-Ende Adapter fusioniert und versucht, den 5'-Bereich bzw. 3'-Bereich des Gens zu amplifizieren.

3.18.4. *in situ* RT-PCR

Diese Methode ist eine Kombination aus RT-PCR und *in situ* Hybridisierung. Man führt eine RT-PCR direkt auf einem Objektträger mit angeschnittenem Gewebe durch. Die Paraffin-

Schnittpräparate wurden in PBS überführt (siehe 3.12.) und für 20 min mit Proteinase (6 µg/ml) behandelt. Danach wurde die Proteinase im Wasserbad bei 95 °C inaktiviert. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und über Nacht bei 37 °C mit RNase-freier DNase (100 U/ml) in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS und Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die reverse Transkription erfolgte unter folgenden Bedingungen:

6 µl 5x RT Puffer
3 µl 10 mM dNTP
2 µl Oligonukleotide
2 µl dTT
1 µl Reverse Transkriptase
16 µl A.dest

Pro Objektträger wurden 20-30 µl Reaktionsansatz benutzt und 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Wasserbad wurde die Reverse Transkription bei 92 °C inaktiviert und nach zweimaligem Waschen mit A.dest wurden die Objektträger luftgetrocknet. Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

5 µl Sinn Oligonukleotid (25 pmol/µl)
5 µl Antisinn Oligonukleotid (25 pmol/µl)
10 µl markierte dNTP
10 µl PCR-Puffer
10 µl 0,01 % Gelatine
2 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5U/µl)
58 µl A.dest

Vom Reaktionsansatz wurden je 20 µl auf die Objektträger gegeben und mit einem Standardprogramm amplifiziert.

3.19. Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

a) Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Aufgrund ihrer negativen Ladung unter neutralen Bedingungen bewegen sich DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld auf den positiven Pol zu. Zur Trennung von DNA-Fragmenten von 1 kb bis zu 40 kb wird Agarose als Trennmatrix verwendet. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist zum einen abhängig von der Größe, der Gesamtladung und der Konformation des DNA-Moleküls und zum anderen von der Porengröße des Agarosegels, sowie von der angelegten Spannung.

1x TAE-Puffer	200 mM Tris-Acetat (pH 7,7)
	10 mM EDTA
1x Auftragspuffer	0,5 % (w/v) Xylencyanol
	0,5 % (w/v) Bromphenolblau
	40 % (v/v) Glycerin in TAE-Puffer

In Abhängigkeit von der gewünschten Trenneigenschaft wurden 1 bis 2 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und schließlich mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration 10 µg/ml) versetzt. Die Agaroselösung wurde dann in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen für das spätere Aufladen der Proben ausgespart. Nach der endgültigen Polymerisation des Gels wurde es mit 1x TAE als Laufpuffer überschichtet.

Die DNA-Proben wurden vor dem Aufladen auf das Gel mit 0,1 VT 10x Auftragspuffer versetzt, um ein Ausspülen der Probe aus den Geltaschen zu verhindern und um die Lauffront im Gel direkt verfolgen zu können. Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente diente ein parallel aufgetragener DNA-Längenstandard bekannter Konzentration, wie z.B. Marker VIII (Boehringer, Mannheim).

Die Auftrennung erfolgte bei 50-100 V Gleichspannung. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte unter einem UV-Transluminator, wobei das DNA-assoziierte Ethidiumbromid als fluoreszierendes Signal sichtbar gemacht wurde.

b) DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen

(„GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“, Pharmacia Biotech)

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich 100 bp bis 48 kb große DNA-Fragmente aus Agarosegelen extrahieren. Das Verfahren beruht auf der Bindung der DNA an eine Glasfasermatrix in Gegenwart von chaotropen Reagenzien, die auf verunreinigende Proteine denaturierend wirken.

Dazu wurde die gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Pro 100 mg Gel wurden 100 µl Capture-Buffer zugegeben und bei 60 °C 10-15 min inkubiert, um die Agarose zu lösen. Schließlich wurde der Reaktionsansatz auf die Glasfasermatrix-Säule gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Zur Zentrifugation (13 000 rpm, 30 sec) wurde die Säule in ein Sammelgefäß gestellt. Die darin aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen. Nach Zugabe von 500 µl ethanolhaltigem Waschpuffer auf die Säule wurde erneut zentrifugiert (13 000 rpm, 30 sec). Die Säule mit der gebundenen DNA wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und es wurden 10-15 µl destilliertes Wasser auf die Matrix gegeben. Nach einminütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz ein letztes Mal zentrifugiert (13 000 rpm, 1 min), um die eluierte DNA im Reaktionsgefäß aufzufangen.

3.20. Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren gibt es viele Möglichkeiten. DNA-Fragmente können gerichtet kloniert werden, so daß sich das zu klonierende Fragment in einer bestimmten Orientierung im Vektor befindet. Hierzu müssen sowohl im Vektor als auch in dem zu klonierenden Fragment durch Restriktionsenzyme verschiedene Enden hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von PCR generierte DNA-Fragmente ungeachtet ihrer Orientierung in den Vektor ligiert.

Für diese Ligationen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: Eine aus mehreren Schritten bestehende Methode und eine mit Hilfe eines käuflich erworbenen Reaktionssatzes (pPCR-Script).

3.20.1. Enzymatische Spaltung von DNA

(Maniatis *et al.*, 1989)

Die Menge des einzusetzenden Enzyms richtet sich u.a. nach der Aktivität des Enzyms. Die Enzymeinheit Unit [U] definiert die Enzymmenge, die 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig schneidet. Desweiteren ist die einzusetzende Enzymmenge abhängig von der Menge der zu schneidenden DNA bzw. von der Anzahl der Schnittstellen in dem betreffenden DNA-Molekül.

Zur Berechnung der benötigten Enzymmenge ergibt sich daher folgende Formel:

$$\text{Notwendige Units/}\mu\text{g DNA} = \frac{48,5 \text{ kb (= bp } \lambda) \times \text{Anzahl der Schnittstellen des Enzyms}}{\text{Größe der DNA (bp)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

Pro Reaktionsansatz wurden 0,2-5,0 µg DNA, das Doppelte der theoretisch berechneten Enzymmenge sowie 1/10 VT des zehnfach konzentrierten, vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffers eingesetzt, so dass die Reaktionsvolumina im Bereich von 20-100 µl lagen. Die Ansätze wurden dann bei der jeweils optimalen Temperatur (30-65 °C, in Abhängigkeit von der Herkunft des Enzyms) für zwei bis drei Stunden inkubiert, um die Vollständigkeit der Reaktion zu gewährleisten. In einigen Fällen wurden in einem Ansatz zwei Restriktionsenzyme gleichzeitig eingesetzt, sofern die Enzyme ihre Aktivität unter gleichen Puffer- und Temperaturbedingungen entfalten.

Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und ggf. zur weiteren Verwendung aus dem Agarosegel isoliert (s. u.).

3.20.2. Ungerichtete Klonierung von DNA in Plasmidvektoren

Die ungerichtete „blunt-end“-Klonierung von DNA beinhaltet drei Schritte, die zur Vorbereitung der DNA und des Plasmidvektors dienen, bevor diese schließlich zusammengefügt werden können.

1. Dephosphorylierung der Vektor-DNA („Cippen“)

CIP 10x Reaktionspuffer	0,2 M Tris/HCl (pH 8,0)
	0,1 M MgCl ₂

Um eine Religation des Vektors nach dem Schneiden mit Restriktionsendonukleasen zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste des offenen Zuckerphosphatgerüsts mittels einer enzymatischen Reaktion abgespalten.

Die Reaktion wurde mit dem Enzym „Alkalische Phosphatase“ aus Kälberdarm (Calf Intestine Phosphatase: CIP) durchgeführt, welches selektiv die Esterbindung der 5'-endständigen Phosphatgruppen spaltet. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 0,5 Units CIP und 0,1 VT 10x CIP-Puffer versetzt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 15 min. Anschließend wurde dem Ansatz erneut 0,5 Units CIP zugesetzt und die Reaktion in einem Wärmewasserbad bei 50 °C für 45 min fortgesetzt. Zuletzt erfolgte die Inaktivierung der Phosphatase durch eine 10 minütige Erhitzung auf 70 °C .

2. „Blunten“ der PCR-Fragmente

Will man PCR Fragmente, die mit *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden oder Restriktionsfragmente mit „sticky-ends“ (Überhängen) in einen „blunt-end“ (ohne Überhänge) geschnittenen Vektor klonieren, so ist es in einigen Fällen nötig, die Überhänge aufzufüllen oder abzuschneiden, da normale *Taq*-Polymerase die Eigenschaft hat, an die amplifizierten DNA-Stücke noch ein zusätzliches –A anzuhängen. Hierfür verwendet man die T4-DNA-Polymerase, die den Überhang auffüllt und Fragmente mit glatten Enden („blunt-end“) schafft.

Zum Glätten der Enden der PCR Fragmente wurde der Reaktionsansatz mit 1,5 µl 10x T4-DNA-Polymerase Puffer und 1 µl T4-DNA-Polymerase versetzt und eine Minute bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 2 µl 2 mM dNTPs hinzugefügt, und der Ansatz wurde für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Zuletzt erfolgte die Deaktivierung der T4-DNA-Polymerase durch fünfminütige Erhitzung auf 70 °C.

Danach wurden die Proben nochmals gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die „gebluntete“ DNA von Pufferresten zu befreien. Bis zur Ligation der Fragmente konnten diese bei –20 °C gelagert werden.

3. Ligation

Bei der Ligation von Vektor-DNA und dem zu klonierenden Fragment wurde dieses und die Vektor-DNA in bestimmten molaren Verhältnissen eingesetzt (Revie *et al.*, 1988). Hierbei war es notwendig, zuvor auf einem Agarosegel die Konzentrationen von Vektor-DNA und dem zu klonierenden DNA-Fragment zu bestimmen. Für die Ligation sollten Vektor und Fragment mindestens äquimolar eingesetzt werden, besser sollte jedoch das zu klonierende Fragment im Überschuß zu der Reaktion gegeben werden. In den meisten Ligationen wurde dabei ein Verhältnis von 1:2 oder 1:3 von Vektor zu Insert verwendet.

In den Ligationsansatz wurde zu 50-100 ng dephosphoriliertem Vektor ein zwei- bis dreifach molarer Überschuß an zu klonierender Insert-DNA gegeben. Der Ansatz enthielt außerdem noch 0,1 VT 10x Ligationspuffer, sowie 1 Unit T4-Ligase. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C im Kryobad. Im Anschluß daran konnte eine Transformation von kompetenten Zellen mit dem Ligationsansatz vorgenommen werden. Wurde er nicht sofort weiterverwendet, konnte er bei –20 °C eingefroren werden.

3.20.3. Ligation und Klonierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kits“

Der "TOPO TA Cloning Kit" bietet eine spezielle Möglichkeit, um PCR-Fragmente ohne Blunt-Reaktion, Dephosphorylieren des Vektors oder DNA-Aufreinigung über ein Gel in den PCR-

Script Vektor zu klonieren. Der Reagenziensatz zeichnet sich durch eine hohe Klonierungseffizienz aus.

Bei dieser Methode wird das PCR-Fragment direkt in die Ligation mit dem Vektor gegeben. Dieser ist schon geschnitten und wird durch eine Topoisomerase an der Religation gehindert. Bei der Ligation löst sich die Topoisomerase innerhalb weniger Minuten und das Fragment ligiert mit dem Vektor.

Die einzigen Voraussetzungen für diese Art der Klonierung sind eine hohe DNA Konzentration und PCR-Fragmente mit überhängenden Enden.

PCR-Fragmente, die mit *Taq*-Polymerase erstellt wurden, tragen ein zusätzliches Adenosinnukleotid, das die Polymerase an die generierten PCR-Enden anhängt. Bei *Pfu*-Polymerase geschieht dies nicht. Diese Polymerase beendet ihre Aktivität immer ohne Überhänge. In diesem Versuch können entweder *Pfu*-generierte Fragmente verwendet werden, oder PCR-Fragmente, die mit *Pfu*-Polymerase poliert wurden. Dabei wird das überhängende A entfernt und die Fragmente liegen ebenfalls „blunt-end“ vor.

Die Klonierung selbst erfolgte in mehreren Schritten:

3.20.4. „Shotgun“-Klonierung

Diese Methode ermöglicht es, mehrere Fragmente in einem Ansatz zu klonieren. Dies ist notwendig, wenn in einer PCR-Reaktion mehrere Fragmente amplifiziert wurden, und es nicht möglich ist, die Fragmente einzeln aus dem Gel zu extrahieren. Die Fragmente aus der PCR-Reaktion werden direkt in einen speziellen Vektor kloniert, der es nicht notwendig macht, daß die DNA aufgereinigt wird (pCR II-TOPO). Da nur immer ein Fragment mit einem Vektor ligiert, erhält man in der anschließenden Isolation von Einzelkolonien eine Präsentation sämtlicher auftretenden Fragmente.

3.21. Herstellung kompetenter Zellen nach Rubidiumchlorid-Methode

RF1-Lösung	10 mM RbCl
	50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
	30 mM KCl
	10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
RF2-Lösung	1 mM MOPS (pH 6,8)
	10 mM RbCl
	75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	14 % (v/v) Glyzerin (85 %ige Stammlösung)

50 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (225 rpm) inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 250 ml LB-Medium mit 5 ml der frischen Übernachtskultur inokuliert. Die Bakterien wurden bei erneuter Inkubation auf dem Schüttler (225 rpm) und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,45–0,6 wachsen gelassen (ca. 2–4 Stunden) und danach in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie für 15 min abzentrifugiert (3000 rpm, 4 °C).

Das Bakterienpellet wurde in 80 ml kalter (4 °C) RF1-Lösung aufgenommen und für 15 min auf Eis gestellt. Nach abermaliger Zentrifugation (3000 rpm, 15 min, 4 °C) erfolgte die Aufnahme diesmal in 20 ml RF2-Lösung und Inkubation für 15 min auf Eis.

Schließlich wurden die Zellen zu je 150 µl pro Eppendorf-Cup aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei –80 °C.

3.22. Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA

Für eine Transformation wurden 100–150 µl kompetente Bakterienzellen auf Eis aufgetaut. Vom vorher hergestellten Ligationsansatz wurden 1–10 µl mit den Bakterienzellen vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend unterwarf man die Zellen für 60 s bei 42 °C einem Hitzeschock und brachte sie für 10 min auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl auf 37 °C vorgewärmten LB-Mediums wurde der Transformationsansatz für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt (225 rpm). Dann wurde der Ansatz für eine Minute bei 3500 rpm anzentrifugiert. Der Überstand wurde so verworfen, daß noch ca. 200 µl im Cup verblieben. In diesen 200 µl wurde das Pellet resuspendiert und ca. 20 µl und 150 µl auf den erforderlichen Selektionsmedien ausplattiert (z. B. LB-Amp-X-Gal-IPTG-Agarplatten).

Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.23. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

(Birnboim und Doly, 1979)

Nach einer Klonierung ist es zunächst notwendig zu testen, ob es sich bei den Transformanten tatsächlich um Klone handelt, die das gewünschte rekombinante Plasmid tragen. Man unterscheidet zum einen eine schnelle Plasmidpräparationsmethode mit geringerer DNA-Ausbeute (Mini-Präparation) und zum anderen eine ertragreichere Präparation besonders reiner DNA (Midi-Präparation). Beide Verfahren basieren auf der Methode der Alkali/SDS-Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

3.23.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Lösung S1

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA

100 µg RNase A/ml

Lösung S2

200 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

Lösung S3

2,55 M KAc/ Essigsäure (pH 4,8)

3 ml LB-Medium (bei vorliegender Antibiotikaresistenz des Plasmids unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums) wurden mit einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Für die Mini-Präparation wurde nur je 1 ml der Kultur verwendet, damit der Rest später, falls nötig verwendet werden konnte, um eine Übernacht-Kultur für eine Midi-Präparation anzupflanzen.

Nach Abzentrifugieren der Zellen in einer Tischzentrifuge (4000 rpm, 5 min) wurde das Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen in 250 µl S1-Lösung resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl S2-Lösung und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Zellen aufgeschlossen. Im Anschluß daran wurden zusätzlich 250 µl Lösung S3 hinzugefügt. Zur Präzipitation der Proteine und der genomischen Bakterien-DNA wurden die Zellen erneut 10 min auf Eis inkubiert und dann für 15 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Cup überführt und 0,8 VT Isopropanol hinzugefügt, um die Plasmid-DNA zu fällen. Abermalige Zentrifugation führte dazu, daß sich ein DNA-Pellet am Boden absetzte. Der Überstand wurde abgezogen und die gefällte DNA durch erneute Zentrifugation (10 min, 13 000 rpm, 4 °C) mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Der getrocknete Niederschlag wurde schließlich in 50 µl A. dest. gelöst.

3.23.2. Midi-Präparation von Plasmid-DNA

(„Jetstar“, GENOMED, Bad Oeynhausen)

E1-Puffer

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA

100 µg RNase A/ml

E2-Puffer	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
E3-Puffer	3,2 mM KAc/Essigsäure (pH 5,5)
E4-Puffer	600 mM NaCl 100 mM NaAc/Essigsäure (pH 5,0) 0,15 % (v/v) Triton X-100
E5-Puffer	800 mM NaCl 100 mM NaAc/Essigsäure (pH 5,0)
E6-Puffer	1,25 M NaCl 100 mM Tris/HCl (pH 8,5)

Zur Präparation größerer DNA-Mengen wurden 50 ml LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) mit 50 µl einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt (225 rpm). Die Bakteriensuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen und bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 4 ml E1 resuspendiert und schließlich durch Zugabe von 4 ml E2 unter leichtem Schwenken lysiert. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurden 4 ml E3 zugegeben. Anschließend wurden chromosomale DNA und Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (6000 rpm, 10 min). Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine zuvor mit Puffer E4 äquilibrierte Anionenaustauschersäule (GENOMED) geladen. Beim langsamen Durchfluß durch die Säule wird die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix gebunden. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 10 ml E5 wurde die Plasmid DNA mit 5 ml E6 eluiert. Das Eluat wurde in Eppendorf-Cups aliquotiert, mit 0,8 VT Isopropanol versetzt und zentrifugiert (13 000 rpm, 30 min, 4 °C), um die DNA zu fällen. Der Niederschlag wurde zweimal mit eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und schließlich in 50-100 µl A. dest. aufgenommen.

3.24. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm photometrisch quantifiziert werden. Aus der Absorption optische Dichte (OD) läßt sich unter der Berücksichtigung der folgenden Parameter die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei einer Küvettendichte von 1 cm berechnen:

doppelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
einzelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
RNA	$\text{OD}_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

3.25. Sequenzierung doppelsträngiger DNA

(Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der biochemischen Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Dieses Verfahren beruht auf der Synthese eines Komplementärstranges zu dem zu sequenzierenden DNA-Fragment, die durch den Zusatz von Didesoxynukleotiden (ddNTP) gezielt, aber statistisch verteilt unterbrochen wird.

Sequenzierungsreaktion

(„T7-Sequencing Kit“, Pharmacia Biotech)

Primer-Bindungspuffer	1 M Tris/HCl (pH 7,6) 100 mM MgCl_2 160 mM DTT
Markierungsgemisch A	1,375 μM dCTP, dGTP, dTTP 333,5 mM NaCl

Enzymverdünnungspuffer	10 mM HCl (pH 7,5) 5 mM DTT 100 µM Tris/g BSA/ml 5 % (v/v) Glyzerin
Stopp-Puffer	0,3 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 % (w/v) Xylencyanol 10 mM EDTA (pH 7,5) 97,5 % (v/v) deionisiertes Formamid

Zur Denaturierung wurden 5 µg der in 18 µl A. dest. gelösten Plasmid-DNA nach Zugabe von 2 µl 10x Denaturierungslösung (2 M NaOH, 2 mM EDTA) für 30 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Die so entstandene einzelsträngige Plasmid-DNA wurde daraufhin in Anwesenheit von 2 µl 3 M NaAc (pH 4,8) und 66 µl eiskaltem Ethanol (96 %) durch Zentrifugation (13 000 rpm, 30 min, 4 °C) präzipitiert. Das Pellet wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in 11 µl A. dest. aufgenommen. Für die Anlagerung des spezifischen Oligonukleotids, das als Startpunkt (Primer) für die DNA-Synthese dient, wurden 1 µl Primerlösung (2,5 pmol/µl) und 2 µl Primer-Bindungspuffer zu der denaturierten Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. In der Sequenzierungsreaktion wird vom angelagerten Primer aus der komplementäre Strang polymerisiert. Dazu wurden 3 µl Markierungsgemisch A, das mit Ausnahme von dATP die drei übrigen dNTPs enthält, 1 µl (α -³⁵S)-dATP (10 µCi/µl), welches die synthetisierten DNA-Fragmente radioaktiv markiert und 2 µl in Enzymverdünnungspuffer verdünnte T7-DNA-Polymerase (Endkonzentration 1U/µl) zur DNA-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde dann für genau 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Termination der Polymerisation findet dann in vier getrennten Reaktionsansätzen statt. Dazu wurden jeweils 4,5 µl des Polymerisationsansatzes zu den bereits in einer Mikrotiterplatte vorbereiteten und für eine Minute bei 37 °C vorgewärmten Didesoxynukleotidlösungen (jeweils 2,5 µl „A-, C-, G-, T-Short-Mix“, Pharmacia) zugegeben. Die Polymerisation, begleitet von Kettenabbruchereignissen, wurde für weitere 5

Minuten bei 37 °C fortgesetzt und schließlich durch Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer endgültig beendet.

Polyacrylamidgelelektrophorese der Sequenzierungsprodukte

1 x TBE-Puffer	89 mM Tris/HCl (pH 8,0) 98 mM Borsäure 2 mM EDTA
Bindsilan	10 ml Ethanol (96 %) 30 µl Alkoxysilan 300 µl Essigsäure (10 %)
Repellsilan	2 % (w/v) Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan

Die Sequenzierungsprodukte wurden in einem 5 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Für das Gel wurden 37,5 g Harnstoff eingewogen. Hinzu kamen 7,5 ml 10x TBE 9,5 ml Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 19:1. Schließlich wurde auf 75 ml mit A. dest. aufgefüllt. Der Gellösung wurden kurz vor dem Gießen 150 µl TEMED und 150 µl APS (10 %ige Stammlösung) zugegeben, um die Polymerisierung einzuleiten.

Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die zuvor unterschiedlich präpariert worden waren. Zunächst wurden beide Platten mit Ethanol und A. dest. gründlich gereinigt. Während eine der Platten mit Bindsilan zur Fixierung des Gels eingerieben wurde, wurde hingegen die andere mit Repellsilan behandelt, um eine Anhaftung des Gels zu verhindern. Um einen Zwischenraum zwischen den Platten zu schaffen, wurden an der rechten und linken Kante 0,2 mm dicke Abstandshalter angelegt. Die beiden Platten wurden nun aufeinander gelegt und mit Hilfe von Klammern fixiert. Zwischen die behandelten Seiten wurde das Gel luftblasenfrei gegossen und ein Kamm für die Aussparung der Probestaschen in die Gellösung gesteckt. Nach der Polymerisation wurde das Gel zusammen mit den Platten in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt und 1x TBE als Laufpuffer appliziert. Es erfolgte ein 30 minütiger Vorlauf bei einer Leistung von

40 W. Zur besseren Wärmeverteilung wurde hinter die Glasplatten eine Aluminiumplatte befestigt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 2 min bei 85 °C auf dem Heizblock hitzedenaturiert und dann für 2 min auf Eis gestellt. Jeweils 2-3 µl der Sequenzierungsansätze wurden in definierter Reihenfolge aufgetragen und für 6-8 Stunden bei einer Leistung von 40 W aufgetrennt. Um einen längeren Sequenzbereich entschlüsseln zu können, wurden parallel ein „Kurz-“ und ein „Langlauf“ durchgeführt. Dazu wurden, nachdem die Laufront der ersten Proben (durch Bromphenolblau markiert) die Mitte des Gels erreicht hatte, die gleichen Proben in der gleichen Reihenfolge auf demselben Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde fortgesetzt, bis die Laufront der später aufgetragenen Proben das Ende des Gels erreicht hatte. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die repellsilikonisierte Glasplatte vorsichtig abgehoben, während das Gel auf der anderen Seite haften blieb. Das Gel wurde nun für 30 min mit Leitungswasser gewässert, um den Harnstoff herauszulösen, und dann für eine Stunde bei 80 °C getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT, Kodak) für 12 Stunden bis zu mehreren Tagen.

3.26. Sondenmarkierung

Für viele Versuche, wie zum Beispiel die Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken, aber auch Southern- und Northern-Blots und *in situ*-Hybridisierung, ist es notwendig, DNA- oder RNA-Fragmente zu markieren und als Sonden einzusetzen.

a) Radioaktive DNA-Markierung

(DNA-Labeling-Kit, Stratagene)

Bei dieser Methode wurden 23 µl DNA (200 ng) mit 10 µl Primermix versetzt und 5 min bei 100 °C inkubiert. Danach wurden auf Eis 10 µl dATP-Mix und 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP hinzugefügt. Die Reaktion wurde mit 1 µl (5 U/µl) Klenow-Enzym in Gang gesetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion versetzte man den Ansatz mit 80 µl Blaulösung.

Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde eine Gelfiltration mit Hilfe einer Schleudersäule durchgeführt. Dazu wurde von einem 0,5 ml Reaktionsgefäß der Deckel abgetrennt und der Boden mit einer Kanüle durchstoßen. Dieses Reaktionsgefäß wurde 2-3 mm hoch mit Glaskugeln abgedichtet und mit 500 µl Biogel P10 Trennmatrix überschichtet. Dann wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ohne Deckel gestellt und für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die in dem großen Reaktionsgefäß aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen, während die Säule in ein verschraubbares 1,5 ml Gefäß transferiert wurde. Der radioaktiv markierte Ansatz wurde nun auf die Säule gegeben und für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Dabei konnten nur hochmolekulare Substanzen (markierte DNA-Stränge) durch die Säule laufen, während einzelne Nukleotide in der durch die nun verwendete Blaulösung gefärbten Matrix zurückgehalten wurden. Die sich im verschraubbaren Reaktionsgefäß befindende DNA-Sonde wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert, danach kurz auf Eis abgekühlt, bevor sie zu einer Hybridisierung verwendet werden konnte.

b) Nichtradioaktive DNA-Markierung
(DIG-Labeling-Kit, Boehringer)

10x Labeling Puffer	477 µl 1M Pipes, pH 6,6
	25 µl 1M MgCl ₂
	3,3 µl β-Mercaptoethanol

Statt mit radioaktiven Nukleotiden wurde das gewünschte DNA-Fragment mit dem DIG-markierten Nukleotid Digoxigenin-11-dUTP markiert.

Wie bei der radioaktiven Methode wurden Zufallsprimer (Hexamere) mit Hilfe des Klenow-Enzyms nach Anlagerung an die DNA-Matrize unter Einbau von DIG-11-dUTP verlängert.

Zirka 200 ng DNA wurden in 9 µl A. dest. aufgenommen und für 5 min gekocht. Danach wurde die Probe für eine Minute in flüssigem Stickstoff inkubiert. Nach kurzer Erwärmung bei RT wurde die DNA-Lösung anzentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4 °C). Auf Eis wurden folgende Komponenten zu der DNA-Lösung gegeben: 2 µl Labeling Puffer, 6 µl Hexamere (Stock: 10 mg/ml), 2 µl dNTP (Labeling-Mix) und 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl).

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C, oder über Nacht bei RT. Die Sonde konnte nun für spätere Verwendung eingefroren oder sofort benutzt werden.

c) Nichtradioaktive RNA-Markierung

10 x Labeling Puffer	400 mM Tris pH 8,0
	60 mM MgCl ₂
	100 mM DTT
	20 mM Spermidin

Für die Herstellung von RNA Sonden wurde das RNA DIG Labeling Kit (Boehringer) verwendet. 3 µg Plasmid DNA wurden linearisiert, aufgereinigt und für die Markierungsreaktion eingesetzt. Mit Hilfe von SP6, T3 oder T7 RNA-Polymerasen wurde ein RNA-Strang synthetisiert. Die Markierung erfolgte unter der Verwendung einer Digoxigenin-11-dUTP enthaltenden dNTP-Mixtur.

3.27. Southern-Blot

(Southern, 1975)

a) Übertragung der DNA

Depurinisations-Puffer	0,25 M HCl
Denaturierungs Puffer	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)
	10 mM EDTA
20x SSC	0,3 M Tris/HCl (pH 7,5)
	3 M NaCl

Southern-Blotting ist die am meisten verwendete Technik, um DNA-Fragmente von Agarose-Gelen auf eine feste Matrix zu überführen.

Die DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde fotografiert und zweimal 10 min in Depurinisations-Puffer bewegt. Danach wurde das Gel zweimal 15 min in Denaturierungs-Puffer und anschließend noch mal für zweimal 15 min in Neutralisierungslösung gewaschen unter leichtem Schwenken gebadet.

Durch die Kapillarkräfte wurde die DNA nun auf die Membran (Hybond-N, Amersham) übertragen, die dem Gel direkt auflag. Dabei diente 10x SSC als Transferpuffer. Die Zeit, in der die DNA vom Gel auf die Membran übertragen wurde, betrug mehrere Stunden oder eine Nacht.

Durch eine Behandlung mit dem UV-Crosslinker wurde die DNA kovalent auf der Membran fixiert.

b) Hybridisierung mit DNA-Sonden

Waschlösung I	2x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung II	0,2x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Hybridisierungslösung	50 ml Formamid 25 ml 20x SSC 0,1 ml Heparin (50 mg/ml) 0,1 ml Tween 20 ad 100 ml A. dest.

Der Filter wurde für mindestens eine Stunde bei 68 °C prähybridisiert. Bei der Verwendung von markierten Oligonukleotiden als Sonde wurde die Hybridisierungstemperatur unter die Schmelztemperatur gesetzt. Bevor die Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben wurde, wurde

sie für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die hitzedenaturierte Sonde wurde auf Eis gestellt und dann zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei der angegebenen Temperatur. Am nächsten Tag wurde die nicht gebundene Sonde entfernt. Dazu wurde die Hybridisierungslösung verworfen, der Filter zweimal 5 min bei RT in Waschlösung I gewaschen und danach für zweimal 15 min bei der Hybridisierungstemperatur in Waschlösung II.

Der Nachweis radioaktiv markierter Sonden erfolgte durch Autoradiographie. Dies geschah durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT, Kodak) für 12 Stunden bis mehreren Tagen. Der Film wurde mit dem ursprünglichen Gelfoto zur Deckung gebracht und auftretende Banden identifiziert.

c) Nachweisreaktion DIG-markierter Sonden

DIG 1	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) 0,15 M NaCl
DIG 2	DIG 1 + 0,5 % (w/v) Blockingreagenz
DIG 3	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5) 0,15 M NaCl 0,05 M MgCl ₂

Nach der Hybridisierung wurden die Filter zunächst für eine Minute in DIG 1 und dann 30 min in DIG 2 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Minute in DIG 1. Die Filter wurden darauf für 30 min in 20 ml DIG 1 plus 4 µl Anti-DIG-Antikörperkonjugat inkubiert. Dem schlossen sich folgende Waschschrte an: 2 x 15 min in DIG 1 und 1 x 2 min in DIG 3. Nun wurde die Farbreaktion eingeleitet. Die Filter ließ man kurz abtropfen, dann wurden sie mit der DNA-Seite nach oben auf eine Plastikfolie (aufgeschnittener Autoklaven-beutel) gelegt. Auf jeden Filter wurde 500 µl Farblösung, bestehend aus DIG 3 + 4,5 µl NBT + 3,5 µl X-Phosphat, pipettiert. Die Farbreaktion erfolgte unter Sauerstoffabschluß bei RT im Dunkeln. Waren positive Signale zu erkennen, wurde die Reaktion mit Wasser gestoppt. Zur Identifikation konnte das Gelfoto mit der Membran verglichen werden.

3.28. Northern-Blot

Northern-Blots dienen dem Nachweis einzelner RNAs mittels spezifischer Sonden. Dazu wird die RNA in einem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der Sonde hybridisiert.

a) Formaldehyd-Agarosegel

Um ein 1,2 %-iges Gel herzustellen, wurden 1,2 g Agarose in 85 ml DEPC-Wasser und 10 ml 10x MOPS-Puffer gemischt und aufgekocht. Anschließend nach der Abkühlung auf ca. 60 °C wird die Lösung mit 5 ml Formaldehyd und 4 µl Ethidiumbromid versetzt. Die Agarose wurde in eine RNase-freie Gelapparatur gegossen und konnte nach 30 min. Polymerisation verwendet werden. Pro Tasche wurden ca. 200-500 ng mRNA oder 10 µg Gesamt-RNA mit Laufpuffer vermischt. Als Marker wurde ein DNA-Marker verwendet. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 3-4 V/cm. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert.

b) Transfer der RNA auf Nylonmembranen

Das Gel wurde genauso auf eine Nylonmembran überführt, wie in 3.26.

c) Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte genauso wie beim Southern Blot (3.26.).

3.29. Herstellung einer embryonalen cDNA-Bibliothek

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung embryonaler cDNA-Bibliotheken für *E. coronatus*. Mit diesen Bibliotheken als Ausgangspunkt sollte es ermöglicht werden, mesoderm- bzw. muskelrelevante Gene zu isolieren und somit einer Charakterisierung zugänglich zu machen. Es wurden mehrere cDNA-Bibliotheken hergestellt (Tab. 3.1.), wovon sich zwei Bibliotheken als geeignet für weitere Arbeiten herausgestellt haben. Im folgenden

werden diese beiden Bibliotheken näher beschrieben, da mit ihnen die spätere Durchmusterung durchgeführt wurde.

3.29.1. PCR-basierte Generierung einer cDNA-Bibliothek in λ -Triplex

3.29.1.1. Isolierung von mRNA

Um eine stadienspezifische cDNA-Bibliothek herzustellen war es notwendig, eine ausreichende Menge mRNA aus den Entwicklungsstadien zu isolieren, die untersucht werden sollten. Benutzt wurde das SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech). Zunächst wurde eine geeignete Menge an mRNA aus Embryonalstadien isoliert. Nach Umschreiben in cDNA wurde die Menge an cDNA mittels PCR signifikant erhöht und anschließend zur Herstellung der Bibliothek verwendet. Diese Methode ist vorteilhaft, da sie mit nur wenig mRNA als Ausgangsmaterial auskommt. Als Ausgangsmaterial wurden 340 mg Embryonen aller Entwicklungsstadien innerhalb des Kokons benutzt. Aus ihnen wurden 500 μ g Gesamt-RNA isoliert. Durch Aufreinigung der Gesamt-RNA konnten 1-5 μ g mRNA isoliert werden (s. Abb. 3.1.).

3.29.1.2. Erststrangsynthese und LD-PCR

Von der aufgereinigten mRNA wurden 80 ng als Matrize für die Erststrangsynthese benutzt. Mit Hilfe von MMLV Reverser Transkriptase (Life Technologies) und den Adapter-Oligonukleotiden SMART II und CDS/3' wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Adapter besitzen zusätzlich noch eine asymmetrische *Sfi* I-Restriktionsschnittstelle. Das Restriktionsenzym *Sfi* I hat die Eigenschaft zwei Sequenzen zu erkennen, nämlich ATTA'T und GCCT'C. Somit kann bei einer Restriktion mit diesem Enzym dafür gesorgt werden, dass zwei ungleiche Schnittstellen entstehen. Da der Vektor über beide *Sfi* I-Erkennungssequenzen verfügt, kann so erreicht werden, dass man die cDNA-Fragmente gerichtet in den Vektor einbringt. Da als Ausgangsmaterial nur wenig mRNA zur Verfügung stand, wurde ein Amplifikationsschritt durchgeführt. So konnte eine größere Menge cDNA-Fragmente für die Ligation bereitgestellt werden. Die Vervielfältigung der cDNA-Fragmente erfolgte über eine LD-PCR („Long distance“, Abb. 4.1.C).

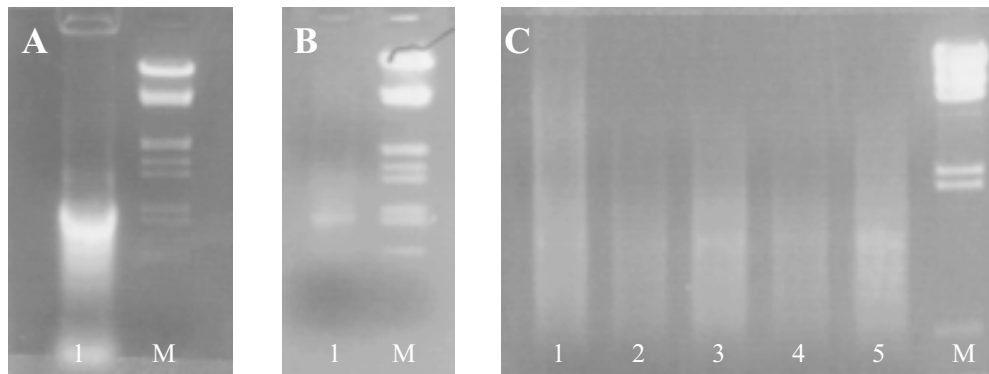


Abb. 3.1.: (A) Gesamt-RNA aus 340 mg Embryonen. 1/50 VT der gewonnenen Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. (B) mRNA aus Gesamt-RNA. 1/10 VT der isolierten mRNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. (C) Dokumentation der LD-PCR. Die im Bild dargestellten Reaktionen unterscheiden sich durch verschiedenen Ausgangsmengen an Erststrangsynthese. Das Bild dokumentiert drei verschiedene Reaktionen. Die Spuren 2 und 3 und die Spuren 4 und 5 zeigen jeweils denselben Ansatz. In den Spuren 2 und 4 wurden 1/20 VT des Gesamtvolumens aufgetrennt, in den Spuren 1, 3 und 5 wurden 1/7 VT aufgetrennt.

In Ansatz 1 wurde die gesamte Erststrangsynthese eingesetzt (10 μ l). In Ansatz 2 und 3 wurden 1/2 VT der Erststrangsynthese eingesetzt und die Ansätze 4 und 5 wurden mit 1/5 VT Erststrangsynthese durchgeführt. Zum Größenvergleich wurde in die benachbarten Spuren jeweils 10 μ l (500 ng) λ -Marker (Eco RI/ Hind III) aufgetragen. Die Reaktionsansätze 2 und 3 wurden zusammengeführt und weiterbehandelt.

3.29.1.3. Größenfraktionierung

Über eine Chroma-Spin-400 Säule (Clontech) wurde eine Größenfraktionierung durchgeführt (Abb. 3.2.), damit kleine, unvollständige cDNA-Bruchstücke nicht in den Vektor ligiert wurden. Nur die cDNA aus den Fraktionen 6-10, die Fragmente zwischen 300 und 6000 Basenpaaren enthielten, wurden gefällt und für die Ligation verwendet.

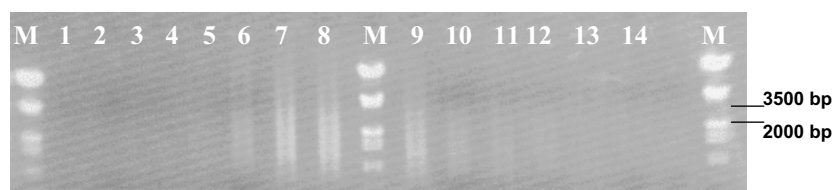


Abb. 3.2.: Größenfraktionierung der amplifizierten cDNAs. Als Größenvergleich wurde in die mit M markierten Spuren 10 μ l des λ -Markers (Eco RI/Hind III) eingesetzt.

3.29.1.4. Ligation in λ -TriplEx II Vektor und Verpackung

Die während der Erst- und Zweitstrangsynthese in die cDNA eingefügten Adapter-Oligonukleotide besitzen beide eine *Sfi* I- Restriktionsschnittstelle. Das 5'-Ende besitzt eine *Sfi* I A Erkennungssequenz und das 3'-Ende eine *Sfi* I B Erkennungssequenz. Über diese konnten die cDNAs gerichtet in den Vektor eingebracht werden, der ebenfalls eine *Sfi* I A und B Erkennungssequenz besitzt. Das bedeutet, dass sich alle cDNA-Fragmente nach der Ligation in der gleichen 5'-3' Ausrichtung in ihrem Vektor befinden. Die in den Vektor ligierten cDNAs wurde anschließend in den Lambda-Phagen verpackt.

3.29.1.5. Titern der Primärbibliothek

Die Güte einer cDNA-Bibliothek wird durch folgende Parameter definiert: dem primären Titer der Bibliothek, dem Anteil leerer Vektoren und der Länge der unabhängigen cDNA-Fragmente. Der Titer einer Bibliothek gibt Aufschluss über ihre Komplexität. Je mehr unabhängige cDNAs in einer Bibliothek vorhanden sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass alle Transkripte des betrachteten Zeitraumes und Gewebes vertreten sind. Die Bibliothek wird umso repräsentativer, je höher der primäre Titer ist. Um den Titer der hergestellten Bibliothek zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und auf NZY-Platten ausplattiert und die Pfu („Plaque forming units“) ausgezählt. Nach folgender Formel konnte der Titer der Bibliothek bestimmt werden:

$$\text{Pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3 \mu\text{l/ml}}{\mu\text{l des ausplattierten Phagenlysats}}$$

Die Bibliothek, die nach dieser Methode erstellt worden ist und den folgenden Arbeiten zugrunde liegt (Nr. 6) besitzt einen primären Titer von 4×10^7 pfu/ml.

3.29.1.6. Amplifikation der cDNA-Bibliothek

SM-Puffer	0,1 M NaCl
	0,01 M MgSO ₄
	0,05 M TrisHCl pH 7,5
	0,01 % Gelatine

Die Amplifikation der primären cDNA-Bibliothek dient der Vermehrung des Ausgangsmaterials. Es wurde somit gewährleistet, dass man eine nahezu beliebige Anzahl von Durchmusterungen der Bibliothek durchführen kann. Zur Amplifikation der cDNA-Bibliothek wurde ein Teil der primären Bibliothek je nach Titer auf eine entsprechende Menge NZY-Agarplatten ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Phagen wurden mit 20 ml SM-Buffer über Nacht bei 4 °C abgeschwemmt und die Überstände gesammelt. Die Phagenüberstände wurden mit Chloroform ausgeschüttelt und anschließend bei 4000 rpm in der Heraeus Megafuge 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aliquots des Überstandes wurden mit 7 % (v/v) DMSO bei -80 °C oder 20 % (v/v) Chloroform bei 4 °C aufbewahrt

Auf diese Weise wurden mehrere cDNA-Bibliotheken hergestellt (Tab. 3.1.). Jede Bibliothek wurde vollständig unabhängig von den anderen generiert, beginnend von der Isolation der Embryonalstadien. Für die weiteren Versuche wurde ausschließlich mit den Bibliotheken Nummer 6 und 7 (s.u.) gearbeitet. Sie besaßen den höchsten Titer. Von ihnen konnte erwartet werden, dass sie die exprimierten Gene in der Embryonalentwicklung am besten repräsentieren. Die Bibliotheken 1–3 wurden zu Bibliothek Nummer 4 zusammengefügt, weil sie einen zu geringen Titer besaßen, um repräsentativ zu sein.

Bibliothek Nr.	Titer	
	primär	amplifiziert
4	$0,8 \times 10^6$ Pfu/ml	2×10^8 Pfu/ml
5	1×10^5 Pfu/ml	Nicht amplifiziert
6	4×10^7 Pfu/ml	4×10^{10} Pfu/ml

Tab. 3.1.: Übersicht der erstellten cDNA-Bibliotheken. Die Bibliotheken 1, 2 und 3 wurden nach der Ligation zu Bibliothek 4 vereinigt. Bibliothek Nummer 5 wurde aufgrund des zu geringen Titers nicht amplifiziert.

Um Missverständnisse zu vermeiden, wird im folgenden nur noch der Begriff TriplEx-Bibliothek für die Bibliothek Nummer 6 verwendet.

3.29.2. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek ohne PCR Amplifikation

Zur Konstruktion der cDNA-Bibliothek wurde der cDNA Synthese Kit und der ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit von Stratagene verwendet. Alle aufgeführten Lösungen und Enzyme wurden von der Herstellerfirma mitgeliefert.

3.29.2.1. Isolierung von mRNA

Bei dieser Standardmethode zur cDNA-Bibliothekssynthese werden 5 µg Poly-A-mRNA für die Erststrangsynthese eingesetzt.

Als Ausgangsmaterial wurden 500 mg Embryonen aller Embryonalstadien eingesetzt, aus denen 700 µg Gesamt RNA isoliert werden konnte (Abb. 3.4.) (siehe 3.16.). Die anschließende mRNA Präparation (3.16.b.) wurde sofort in die Erststrangsynthesereaktion eingesetzt.

3.29.2.2. Erst- und Zweitstrangsynthese

5 µg mRNA wurden in 32,5 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde dann zu einem Syntheseansatz bestehend aus 5 µl 10x Erststrangpuffer, 3 µl Erststrang-Methyl-dNTP-Mix, 2 µl Oligonukleotide und 1 µl Ribonuklease-Inhibitor pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Primerbindung zu ermöglichen. Das besitzt zusätzlich noch eine *Xho* I Schnittstelle. Zu dem Ansatz wurde 1,5 µl MMLV Reverse Transkriptase (50 U/µl) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Erststrangsyntheseansatz wurde auf Eis gestellt und 20 µl 10x Zweitstrangpuffer, 6 µl Zweitstrang-Nukleotid-Mix und 115,9 µl steriles Wasser zupipettiert. Zu diesem Ansatz wurden 2 µl RNase H (1,5 U/µl) und 11,1 µl DNA Advantage2-Polymerase Mix (9 U/µl, Clontech) zugegeben. Die Reaktion wurde gemischt, zentrifugiert und für 2,5 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Zweitstrangsynthese kamen 23 µl „blunting dNTP Mix“ und 2 µl „cloned *Pfu* DNA Polymerase“ (2,5 U/µl). Die Reaktion wurde 30 min bei 72 °C inkubiert. Dann wurden 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) zupipettiert, gemischt und 2 min bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase mit der cDNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Volumenteil Chloroform dazupipettiert. Erneut wurde gemischt und zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und die cDNA nach Zugabe von 20 µl 3M Na-Acetat und 400 µl 96 %-igem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die cDNA wurde 1 h bei 13 000 rpm und 4 °C

in der Zentrifuge pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 8 µl EcoRI-Adapter-Lösung resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Zum Ansatz wurden dann 1 µl 10x Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM rATP und 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl) pipettiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 8 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte bei 70 °C für 30 min.

Nach Inaktivierung der Ligation wurden 1 µl 10x Ligase-Puffer, 2 µl 10 mM rATP, 6 µl steriles Wasser und 1 µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl) zum Ansatz pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann 30 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Das Fragment besitzt nun zwei *Eco* RI-. Um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen, wird über die im Erststrang-Oligonukleotid vorhandene *Xho* I-Schnittstelle eine *Eco* RI- Restriktionsschnittstelle abgetrennt. Für die Spaltung mit *Xho* I wurden 28 µl *Xho* I Puffer-Ansatz und 3 µl *Xho* I (40 U/µl) zupipettiert und der Reaktionsansatz 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

3.29.2.3. Größenfraktionierung der cDNA-Fragmente über eine Chroma-Spin-400 Säule

Um möglichst komplette cDNAs zu erhalten und kleine cDNA-Stücke abzutrennen wurde eine Größenfraktionierung über eine Gelfiltrations-Säule durchgeführt. Dazu wurde eine Chroma-Spin-400 Säule (Clontech, SMART cDNA Library Construction Kit) equilibriert und auf Raumtemperatur gebracht. Die Matrix wurde resuspendiert und der untere Verschluss geöffnet. Die Säule wurde mit 700 µl Puffer beladen. Nachdem der Puffer durchgelaufen war, wurde die cDNA in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf die Säule gegeben. Nachdem die Lösung in die Säule eingezogen war, wurden weitere 100 µl Puffer auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde verworfen. 15 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden unter die Säule gebracht. Nach Zugabe von 600 µl Puffer wurden die austretenden Tropfen (ca. 35 – 40 µl) einzeln in je einem Reaktionsgefäß aufgenommen. Jeweils 3 µl wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und die Größe der Fragmente elektrophoretisch bestimmt (Abb. 3.4.). Nach der Größenfraktionierung der cDNA wurden die Fraktionen 6, 7 und 8 zusammengeführt und für die Ligation mit dem Vektor eingesetzt. Diese enthielten die längsten Fragmente und waren somit die besten Kandidaten für vollständige cDNAs.

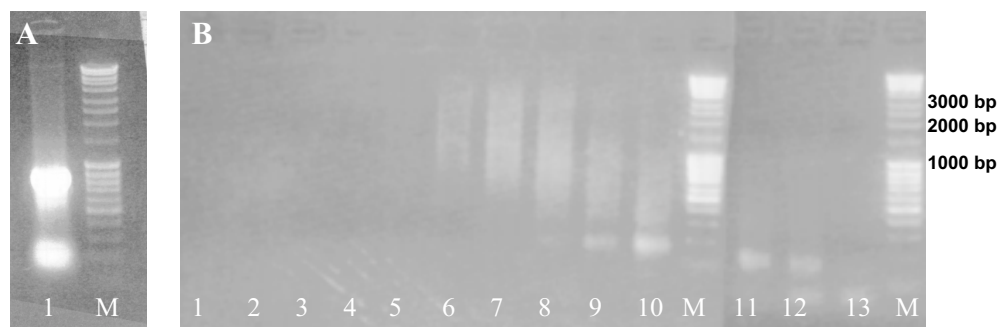


Abb. 3.4.: (A) Gesamt-RNA aus 500 mg Embryonen. Die isolierte RNA wurde in 300 μ l A. dest. aufgenommen und 2 μ l zur Analyse aufgetragen. (B) Größenfraktionierung der cDNAs. Eindeutig zu erkennen sind die Größenunterschiede der einzelnen Fraktionen. Als Größenstandard wurden in (A) und (B) 4 μ l des Mix-Ladder Markers aufgetragen.

3.29.2.4. Ligation in Uni-Zap XR Vektor und Verpackung

Die Ligation der cDNAs in den Vektor Uni-Zap XR wurde über die *Eco* RI Restriktionsschnittstelle und die *Xho* I Schnittstelle ermöglicht. Vektoren ohne cDNA treten nur dann auf, wenn die Restriktion der Vektor-DNA nicht erfolgte. Somit befanden sich alle cDNA-Fragmente nach der Ligation in der gleichen 5'-3' Ausrichtung in ihrem Vektor

Zur Ligation der cDNA in die Vektor-Arme wurden 100 ng cDNA zu einem Reaktionsgemisch mit 0,5 μ l 10x Ligase-Puffer, 0,5 μ l 10 mM rATP, pH 7,5 und 1 μ l Vektor-Arme (1 μ g/ μ l) pipettiert. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 4,5 μ l aufgefüllt und nach Zugabe von 0,5 μ l T4 Polymerase über Nacht bei 12 °C inkubiert.

Ein Aliquot Verpackungsextrakt wurde angetaut, 1 μ l des Ligationsansatzes zupipettiert und die Reaktion mit der Pipettenspitze leicht vermischt. Der Ansatz wurde 1,5 - 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform versetzt. Die Reaktion wurde leicht gemischt und dann kurz anzentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.29.2.5. Titer der Primärbank

Um den Titer der hergestellten Bibliothek zu bestimmen wurde 1 μ l der Lösung und 1 μ l einer 1:10 Verdünnung wurden auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Dazu verwendete man Top-Agarose, die 2,5 mM IPTG und 4,2 mg/ml X-Gal enthielt. Die Platten wurden über Nacht bei 37

°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Plaques ausgezählt. Nach bereits beschriebener Formel konnte der Titer der Bibliothek bestimmt werden. Diese primäre Bibliothek (λ -Zap) besitzt einen Titer von $1,6 \times 10^7$ Pfu/ml.

3.29.2.6. Amplifikation der primären cDNA-Bibliothek

Zur Amplifikation der cDNA-Bibliothek wurde ein Teil der primären Bibliothek je nach Titer auf eine entsprechende Menge NZY-Agarplatten ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Phagen wurden mit 20 ml SM-Buffer über Nacht bei 4 °C abgeschwemmt und die Überstände gesammelt. Die Phagenüberstände wurden mit Chloroform ausgeschüttelt und anschließend bei 4000 rpm in der Heraeus Megafuge 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aliquots des Überstandes wurden mit 7 % (v/v) DMSO bei -80 °C oder 20 % (v/v) Chloroform bei 4 °C aufbewahrt. Zum Schluss wurde der Titer der amplifizierten Phagenbibliothek bestimmt. Der Titer nach der Amplifikation betrug $4,3 \times 10^{11}$ Pfu/ml. Für die Bibliothek Nummer 7 wird im folgenden nur noch der Begriff λ -Zap-Bibliothek benutzt.

3.30. Durchmustern einer Bibliothek durch Hybridisierung mit einer DNA Sonde

3.30.1. Hybridisierung

Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl
Hybridisierungspuffer (Church-Puffer) (Church and Gilbert, 1984)	0,5 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) 7 % SDS 1 % BSA 1 mM EDTA

Waschlösung I	2x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung II	0,2x SSC 0,1 % (w/v) SDS

Zur Durchmusterung einer Phagenbibliothek wurden insgesamt 6×10^5 pfu nach Infektion phagenkompetenter Bakterien auf 20 NZY Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend 2 Filterabzüge je Platte angefertigt. Dazu wurden Nylonmembranen (Hybond N) unter Vermeidung von Luftblasen auf die Platten aufgebracht und für 2 min (2. Abzug: 4 min) aufgelegt, so dass die Phagen an die Membran anhaften konnten. Die Position der Filter wurde durch entsprechende Markierungen auf den Filtern und Platten festgehalten. Die Filter wurden vorsichtig abgenommen und für 2 min auf mit Denaturierungspuffer getränktes Whatman 3MM Papier gelegt. Anschließend wurden sie auf weiteres Whatman 3MM Papier transferiert, welches mit Neutralisierungspuffer getränkt war. Die Filter wurden darauf 4 min inkubiert und dann vier min in 2x SSC gewaschen. Zur Fixierung der DNA auf der Nitrocellulosemembran wurden die Filter nach Lufttrocknen im UV-Crosslinker behandelt.

Die Filter wurden nach der Methode von Church und Gilbert (Church und Gilbert, 1984) mit einer ^{32}P -dATP markierten Sonde hybridisiert. Dazu wurden die Filter in Plastikschalen (20 Filter je Schale) 4 h bei 65 °C in 200 ml Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte im gleichen Puffer über Nacht bei 65 °C nach Zugabe einer denaturierten, ^{32}P -dATP radioaktiv markierten DNA Sonde. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zunächst bei Raumtemperatur mit niedrigstringentem Waschpuffer zweimal kurz gewaschen. Dann folgten mehrere Waschschrte mit hochstringentem Waschpuffer, wobei die Temperatur schrittweise erhöht wurde. Wenn die Strahlung der Filter nur gering über der Hintergrundstrahlung lag, wurden die Filter auf mit Plastiktüten beklebten Kartons ausgelegt und mit Haushaltsfolie abgedeckt. In einer Expositions-kammer wurden die Filter auf Kodak Biomax Filmen bei -80 °C 1-5 Tage exponiert.

3.30.2. Isolierung eines Einzelphagen und Präparation von Phagen-DNA

SM-Puffer	100 mM NaCl
	20 mM MgSO ₄
	50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	0,001 % Gelantine

Bereiche um doppelt positive Signale auf den Röntgenfilmen wurden mit einer gekürzten 1 ml Plastikpipettenspitze aus der Agarplatte ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform gevortext. Die Extraktion der Phagen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Diese Lösung wurde weiter eingesetzt, um erneut Bakterien zu infizieren und so eine Anreicherung und Vereinzelung von Phagen zu erreichen. Von entsprechenden Agarplatten wurden wieder Filterabzüge genommen und mit der Sonde hybridisiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis ein Signal eindeutig einem solitär liegenden Phagenplaque zugewiesen werden konnte. Der Plaque wurde ausgestochen und extrahiert.

a) Exzision von Phagen-Inserts mit Helferphagen

Bei Verwendung der λ -ZAP Express cDNA Bank konnten isolierte Phagen durch Einsatz des Helferphagen ExAssist direkt in Plasmidvektoren und Insert umgeschrieben und in entsprechende Bakterien (SOLR) transformiert und vermehrt werden.

Dazu wurden 200 µl XL1-Blue MRF' Bakterien ($OD_{600nm} = 1.0$) mit 250 µl Einzelphageneluat und 1 µl ExAssist ($> 1 \times 10^5$ pfu) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 3 ml LB-Medium zupipettiert und weitere 3 Stunden unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 20 minütige Denaturierung bei 70 °C. Die Bakterien wurden durch 15 min Zentrifugation bei 1000 rpm in der Heraeus Megafuge pelletiert und dann der Überstand mit den exzisierten Vektor-DNAs in ein neues Röhrchen überführt. 10 µl dieses Überstandes wurden mit 200 µl SOLR Bakterien ($OD_{600nm} = 1.0$) für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 100 µl dieses Transformationsansatzes auf Kanamycinplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht

bei 37 °C inkubiert und mit Kulturen aus Einzelklonen Mini-Präparationen zur Analyse durchgeführt.

b) Umwandlung des λ TriplEx2 Phagen in pTriplEx Phagemid

Durch Cre/Lox Rekombination ist es möglich, den λ TriplEx2 Phagen in ein Phagemid umzuwandeln.

Dazu wurden 200 μ l BM 25.8 Bakterien ($OD_{600nm} = 1.0$) mit 150 μ l Einzelphageneluat für 30 min bei 31 °C inkubiert. Dann wurden 400 μ l LB-Medium zupipettiert und eine weitere Stunde unter Schütteln bei 31 °C inkubiert. 1–10 μ l der infizierten Zellen wurden auf LB/Ampicillin Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 31 °C inkubiert und mit Kulturen aus Einzelklonen Mini-Präparationen zur Analyse durchgeführt.

3.31. Antikörperfärbung

Lösepuffer	5 % Mercaptoethanol 1 % Triton X-100 in 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)
PBT	PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20
Collagenaselösung	1000 U/ml Collagenase 1 mM $CaCl_2$ 0,1 % Triton X-100 in 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)
PBTB	PBT + 2 mg/ml BSA

Die fixierten Würmer (siehe 3.11.) wurden in PBS überführt. Zur Auflockerung des Gewebes erfolgte eine Inkubation über Nacht mit Lösepuffer bei 37 °C unter leichtem Schwenken. Bei

Embryonen wurde die Inkubationszeit auf vier Stunden gekürzt. Anschließend wurden die Anneliden für 6 Stunden in PBT bei Raumtemperatur gewaschen. Das PBT wurde mehrmals abgezogen und durch frisches ersetzt. Die Inkubation mit der Collagenaselösung erfolgte bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler. Danach wurde die Lösung abgezogen und unter mehrmaligem Wechseln der Lösung zwei Stunden mit PBT gewaschen. Zum Blocken der Probe wurden die Würmer zwei Stunden in PBTB inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit dem Antikörper in PBTB (1:1000–1:2500) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der ungebundene Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBTB heraus gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:100) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBT heraus gewaschen. Die Färbung konnte mit dem Mikroskop beobachtet werden.

3.32. *in situ*-Hybridisierung (*E. coronatus*)

(nach Tautz und Pfeifle, 1989)

a) Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Hybridisierungslösung	50 % Formamid
	5 x SSC
	10 µg/ml tRNA
	50 µg/ml Heparin
	0,1 % Tween
	0,5 % Triton X-100

Fixierte Embryonen wurden 5x5 min in einem Eppendorf-Cup mit 1x PBT gewaschen. Darauf wurden sie für genau 1,5 min mit PBT/Protease K (50 µg/ml Stammlösung) im Verhältnis 100:1 inkubiert. In dieser Zeit sanken sie auf den Boden des Cups. Der Überstand wurde abgesaugt, die Embryonen sofort mit 100 µl Glycin (Stock 20 mg/ml) und 900 µl PBT überlagert und 3 min bewegt. Nach dem Absinken der Embryonen wurde 3x 5 min in PBT gewaschen. Anschließend kamen sie zur erneuten Fixierung für 20 min in 4 % Formaldehyd/PBT. Es folgten wieder

Waschschritte (5x 5 min in PBT). Die Embryonen inkubierten daraufhin für 10 min in einem Gemisch aus PBT und Hybridisierungslösung (1:1) und anschließend für 10 min in Hybridisierungslösung. Der Überstand wurde abgezogen, mit Hybridisierungslösung aufgefüllt (1 ml) und eine Stunde bei 45 °C zur Anpassung an die beabsichtigte Hybridisierungstemperatur in einem Thermoblock vorinkubiert. Nach 45 min wurde 4 µl der DIG-markierten Sonde in 36 µl Hybridisierungslösung verdünnt und für 15 min gekocht. Zwischendurch wurde der gesamte Überstand von den Embryonen genommen, ohne das Cup aus dem Thermoblock zu nehmen. Die Sonde wurde luftblasenfrei direkt zu den Embryonen gegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgte die Inkubation über Nacht im Thermoblock bei 45 °C.

Am nächsten Tag wurde der Überstand entfernt und 3x 20 min mit vortemperierter Hybridisierungslösung im Thermoblock bei 45 °C gewaschen. Danach wusch man 20 min mit 500 µl Hybridisierungslösung bei RT und für 15 min mit Hybridisierungslösung/PBT (1:1). Jetzt konnte für 5x 20 min in PBT gewaschen werden.

Währenddessen wurde parallel zu den Waschschritten der anti-DIG-Antikörper präadsorbiert, um Hintergrund zu vermeiden. Hierzu wurden in Methanol gelagerte *Drosophila*-Embryonen (Bereitstellung durch A. Paululat) 3x 20 min in PBT gewaschen. Schließlich gab man den anti-DIG-Antikörper 1:50 verdünnt in PBT für eine Stunde zu den Embryonen. Zum Gebrauch wurde der Antikörper auf eine Endkonzentration von 1:2000 gebracht.

Die Antikörperinkubation der Wurmembryonen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde mit PBT 4x 20 min gewaschen. Dann wurden die Embryonen in DIG3 + 0,5 % Tween 20 überführt und 2x 10 min äquilibriert. Mit Hilfe einer blauen Eppendorf-Spitze wurden die Embryonen in ein silikonisiertes Glasblöckchen überführt. Die Lösung wurde soweit wie möglich abgesaugt und 1 ml Färbelösung, bestehend aus DIG3/Tween 20 + 3,5 µl NBT + 3,5 µl X-Phosphat, zugegeben. Die Färbung ließ man im Dunkeln stattfinden. Durch mehrmaliges Waschen in PBT konnte sie gestoppt werden. Die Embryonen wurden 3x 10 min mit abs. Ethanol gewaschen und konnten darin auch für längere Zeit aufbewahrt werden. Zur Betrachtung unter dem Mikroskop wurden sie in Epon eingebettet.

b) *in situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten

MABT-Puffer	100 mM Maleinsäure
	150 mM NaCl (pH 7,5)
	0,1 % Tween 20
Entwicklungspuffer	100 mM Tris/HCL (pH 9,5)
	100 mM NaCl
	50 mM MgCl ₂

Die Paraffin-Schnitte wurden über eine Alkoholreihe in PBS überführt (siehe 3.12.). Die Fixierung erfolgte mit einer 4 % Paraformaldehyd/PBS Lösung für eine Stunde. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte nach mehrmaligem Waschen mit PBS in 1 %iger Wasserstoffperoxid/PBS Lösung inkubiert. Um die Membranen zu permeabilisieren wurden die Objektträger mit Proteinase K für 20 min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit 0,25 % Triton X-100. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 0,2 M HCl behandelt, anschließend 10 min in 0,1 M TEA inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Objektträger mit 2x SSC bei 50 °C gewaschen und luftgetrocknet.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C in einer feuchten Kammer. Pro Objektträger wurden 25 µl Hybridisierungslösung benutzt. Das Herauswaschen der freien Sonde erfolgte mit 2x SSC für 5 Minuten bei 58 °C, dann für 30 min mit 2x SSC bei 58 °C, darauf mit 50 % Formamid in 1x SSC für 20 min bei 58 °C und schließlich noch mit 0,1x SSC für 45 min bei 62 °C.

Zur Detektion wurden die Schnitte in MABT-Puffer equilibriert, dann 30 min in Blockierlösung gelegt und über Nacht bei 4 °C mit dem Zweitantikörper inkubiert. Die Schnitte wurden darauf für 4-5 Stunden mit MABT-Puffer gewaschen und schließlich in Entwicklungspuffer equilibriert.

Die Färbung erfolgte im Dunkeln in Färbepuffer der mit NBT und X-Phosphat versetzt wurde (pro ml Färbepuffer wurden 4,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat verwendet). Durch mehrmaliges Waschen mit MABT-Puffer wurde die Färbung gestoppt. Die Betrachtung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mikroskops.

4. Ergebnisse

4.1. Verifizierung der embryonalen cDNA-Bibliotheken von *Enchytraeus coronatus*

4.1.1. Verifizierung der TriplEx-Bibliothek

Um die Größe der cDNA-Fragmente und die Anzahl der insertlosen Phagen zu bestimmen, wurden 80 Phagenplaques aus dem Bakterienrasen ausgestochen und nach in vivo-Exzision mit Hilfe einer Restriktionsanalyse untersucht. Das verwendete Enzym *Pvu II* schneidet 5' sowie 700 bp 3' der Klonierungsstelle (Abb. 3.3.A). Das ebenfalls geeignete Enzym *Sfi I* wurde aus Kostengründen nicht eingesetzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass 50 der 80 Phagen ein cDNA-Fragment besitzen. Das entspricht ungefähr 60 %. Selbst hergestellte Bibliotheken liegen typischerweise im Bereich von 60-80 % (Gubler and Hoffmann, 1983; Kato *et al.*, 1994). Die hier hergestellte Bibliothek liegt also im unteren Bereich. Die Länge der isolierten Fragmente schwankt zwischen 600 und 1300 Basenpaaren (Abb. 3.3.B).

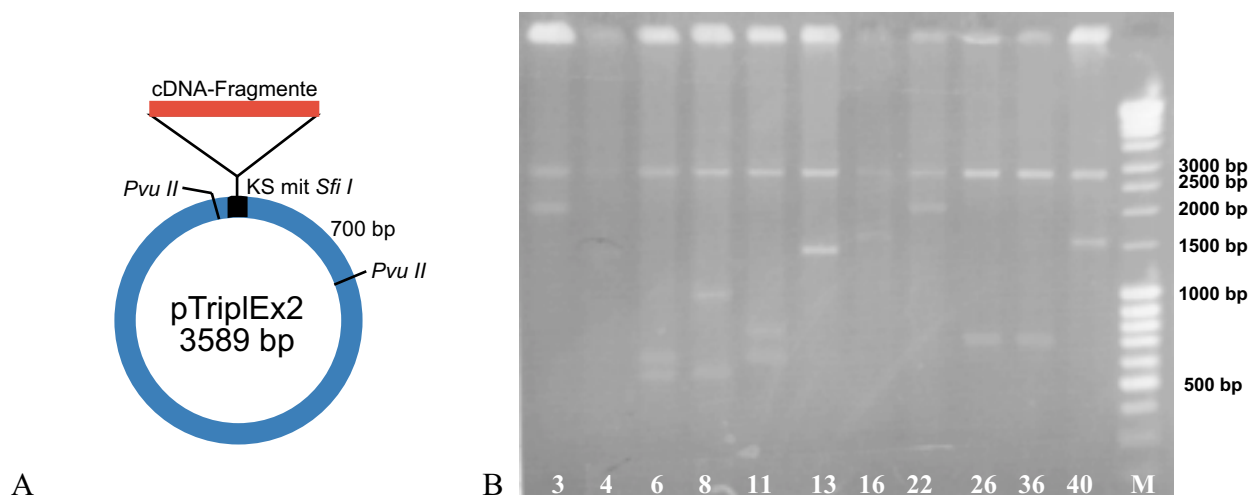


Abb. 4.1.: (A) Vektorkarte des pTriplEx2-Phagemids nach in vivo Exzision mit *Pvu II* Restriktionsstellen. (KS) Klonierungsstelle mit *Sfi I* Schnittstellen, über die alle Fragmente mit dem Vektor ligiert wurden. (B) Restriktionsanalyse der zufällig isolierten cDNAs. Der Klon 26 und 36 enthält keine Inserts, da nur das 700 bp große Fragment des Vektors zu erkennen ist. In anderen Spuren

sind Fragmente von 600 bp (Nr. 8) bis zu 1,3 kb (Nr. 3 und 22) zu erkennen. Doppelbanden treten dann auf, wenn in der cDNA noch interne *Pvu II* Schnittstellen vorhanden sind.

4.1.2. Verifizierung der λ -Zap-Bibliothek

Für die Größenbestimmung der ligierten cDNAs wurden 50 Phagenplaques ausgestochen und nach in vivo Excision in einer Restriktionsanalyse untersucht (Abb. 4.5.). Hier wurden die Enzyme *Eco RI* und *Xho I* verwendet, über die die Fragmente auch in den Vektor ligiert wurden. Die ausgeschnittenen Fragmente hatten eine Länge zwischen 500 und 2200 Basenpaaren. Von den 50 präparierten Phagen beinhalteten 12 keine cDNA. Das sind über 75 % Vektoren, die über eine cDNA verfügen. Diese Bibliothek liegt im oberen Bereich der Effizienz einer selbst hergestellten Bibliothek.

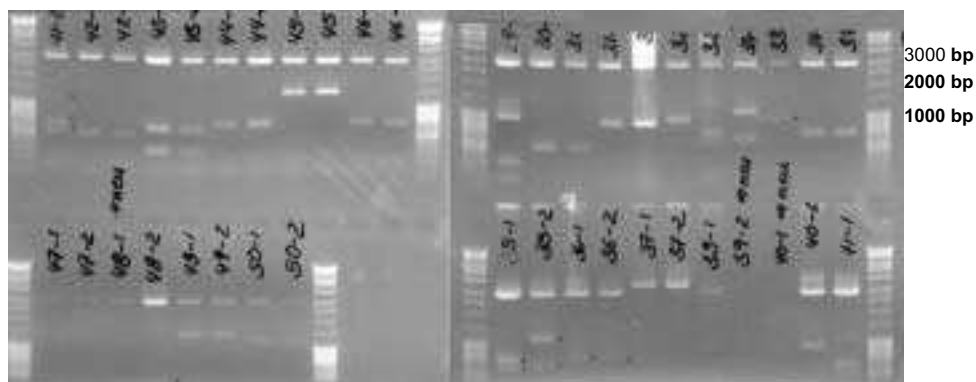


Abb. 4.2.: Analyse der Insertgrößen von Bibliothek Nr. 7. Der Vektor Uni-Zap XR hat selbst eine Größe von 3 Kb. Als Längenmarker wurde der Mix-Ladder Marker aufgetragen.

4.2. Weitere Analysen zur Qualität der hergestellten cDNA-Bibliotheken

Die primären Bibliotheken TriplEx und λ -Zap waren der Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen. Um Aussagen über die Qualität der Bibliotheken treffen zu können, wurden für jede Bibliothek 5 unabhängige isolierte Klone ansequenziert. Zunächst konnten an den jeweiligen 5'- bzw. 3'-Enden die Adapter-Oligonukleotide identifiziert werden. Die Fragmente lagen alle in derselben Orientierung im Vektor, wie man anhand der Adapter erkennen konnte.

Bei einer Datenbankabfrage der abgeleiteten Proteinsequenzen aller 10 cDNAs über NCBI-BLAST konnte bei 9 Klonen keinerlei Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen festgestellt werden. Es wurden 300 bp des 5'- bzw. 3'-Bereichs ansequenziert. So ist es sehr wahrscheinlich, dass nur untranslatierte Region ansequenziert wurde. In einer Proteinsequenz konnte eine Homologie zu verschiedenen Proteinen der HMG-Familie erkannt werden. HMG-Proteine sind Transkriptionsfaktoren und spielen bei vielen Prozessen eine Rolle. Die Abfrage ergab eine Übereinstimmung von 40 % auf Proteinebene zu Proteinen der HMG-Familie verschiedener Spezies. Die größten Übereinstimmungen zeigte die Sequenz mit Proteinen von *C. elegans* (*C. elegans* Seq. Consort., 1998), *D. melanogaster* (Sparkes, 2001), *H. sapiens* (Jay, 1995), *D. rerio* (de Martino, 2000) und *A. mississippiensis* (Coriat, 1993).

Innerhalb der HMG-Box ergab sich eine Übereinstimmung von über 75 % (Abb. 4.6.). Da HMG-Proteine allerdings keine bekannten Funktionen bei der Muskel- oder Mesodermentwicklung besitzen, wurde das isolierte Fragment nicht weiter analysiert, sondern diente nur in unterschiedlichen Experimenten als Kontrolle.

H I K R P M N A F M V W S Q M E R R K I	Sox- Domäne <i>C. elegans</i>
H I K R P M N A F M V W S K I E R R K I	SOX-Domäne <i>danio rerio</i>
H I K R P M N A F M V W S R L Q R R Q I	Sox-Domäne <i>Droso</i>
H I K R P M N A F M V W S K I E R R K I	Sox-Domäne human
H I K R P M N A F M V W S Q I E R R K I	Sox-Domäne RC1 Protein
- V K R P M N A F M V W S Q I E R R K I	SRY-rel. Alligator
C E H Q P D M H N A E I S K Q L G S R W	Sox- Domäne <i>C. elegans</i>
M E Q S P D M H N A E I S K R L G K R W	SOX-Domäne <i>danio rerio</i>
A K D N P K M H N S E I S K R L G A E W	Sox-Domäne <i>Droso</i>
M E Q S P D M H N A E I S K R L G K R W	Sox-Domäne human
S E V A P E M H N A E I S K R L G M R W	Sox-Domäne RC1 Protein
M E Q S P D M H N A E I S K R L G K R W	SRY-rel. Alligator
R S L T D E E K A P F V A E A E R L R V	Sox- Domäne <i>C. elegans</i>
K M L K D S E K I P F I R E A E R L R L	SOX-Domäne <i>danio rerio</i>
K L L A E S E K R P F I D E A K R L R A	Sox-Domäne <i>Droso</i>
K M L K D S E K I P F I R E A E R L R L	Sox-Domäne human
K K L S E V E R Q P F V E A E R L R L	Sox-Domäne RC1 Protein
K L L K D S D K I P F I R E A E R L R L	SRY-rel. Alligator
C H M Q E Y P D Y K Y K P R K K P - - -	Sox- Domäne <i>C. elegans</i>
Q H M A D Y P D Y K Y R P K K K P - - -	SOX-Domäne <i>danio rerio</i>
L H M K E H P D Y K Y R P R R K P K - -	Sox-Domäne <i>Droso</i>
K H M A D Y P D Y K Y R P R K K P - - -	Sox-Domäne human
L H C Q E Y P D Y K Y R P R K R A T A V	Sox-Domäne RC1 Protein
K H M A D Y P D Y K Y R P - - - - -	SRY-rel. Alligator

Abb. 4.3.: Sequenzvergleich der HMG-Box *C. elegans*, *sox11* (*D. rerio*), *Dsox14* (*D. melanogaster*), *sox11* (*H. sapiens*) und *sry-rel* (*A. mississippiensis*).

4.3. Durchmusterung der Bibliotheken und Isolierung eines *RTK*-homologen Fragments

4.3.1. Durchmustern mit heterologen Sonden

Um potentielle Kandidaten-Gene zu isolieren, die in der Entwicklung des Mesoderms oder der Muskulatur bei *E. coronatus* eine wichtige Rolle spielen, wurden die cDNA-Bibliotheken mit heterologen Sonden durchsucht. Es wurden die hochkonservierten Bereiche der *Drosophila melanogaster* Gene *twist*, *mef2* und *heartless* zur Herstellung von Sonden gewählt und diese wurden über PCR amplifiziert (Abb. 4.3.B). So wurde für *heartless* ein 1,1 kb Fragment mit den Oligonukleotiden DFR1 1184-1204 Fw und DFR1 2200-2182 amplifiziert. Für *twist* gelang es, mit den Oligonukleotiden Dtwi 1199-1220 Fw und Dtwi 1599-1578 Rv ein 550 bp Fragment zu amplifizieren. Für *mef* wurden die Oligonukleotide Dmef 469-490 Fw und Dmef 1004-987 Rv benutzt, um ein 400 bp Fragment zu amplifizieren.

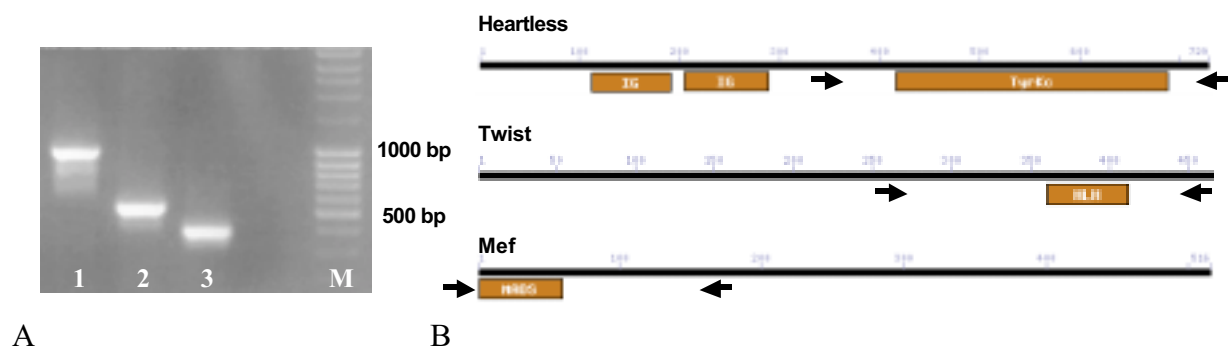


Abb. 4.3.: (A) Dokumentation der PCR zur Sondenherstellung von D-*heartless* (1), D-*twist* (2) und D-*mef* (3). (B) Übersicht über die Proteine Heartless, Twist, Mef und ihre konservierten Domänen. Die Pfeile zeigen die Lage der abgeleiteten Oligonukleotide.

Die Fragmente wurden radioaktiv markiert. Mit diesen Sonden wurden die Bibliotheken TriplEx und λ -Zap durchmustert. Nach mehreren Durchgängen konnte aus der λ -Zap Bibliothek mit der *heartless*-Sonde und der *twist*-Sonde je ein Klon isoliert werden. Der Fokus dieser Arbeit lag hauptsächlich auf der weiteren Charakterisierung des *heartless*-ähnlichen Fragments. Mit dem markierten Fragment von *mef2* war es bis jetzt noch nicht möglich, positive Klone aus den

cDNA-Bibliotheken zu isolieren, eine partielle cDNA konnte jedoch mittels RT-PCR amplifiziert werden.

4.3. Isolierung eines Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) Fragments

Die isolierte cDNA besaß eine Länge von 2,7 kb. Dieser Klon wurde vollständig sequenziert. Es konnten auf beiden Seiten die Adapteroligonukleotid-Sequenzen identifiziert werden.

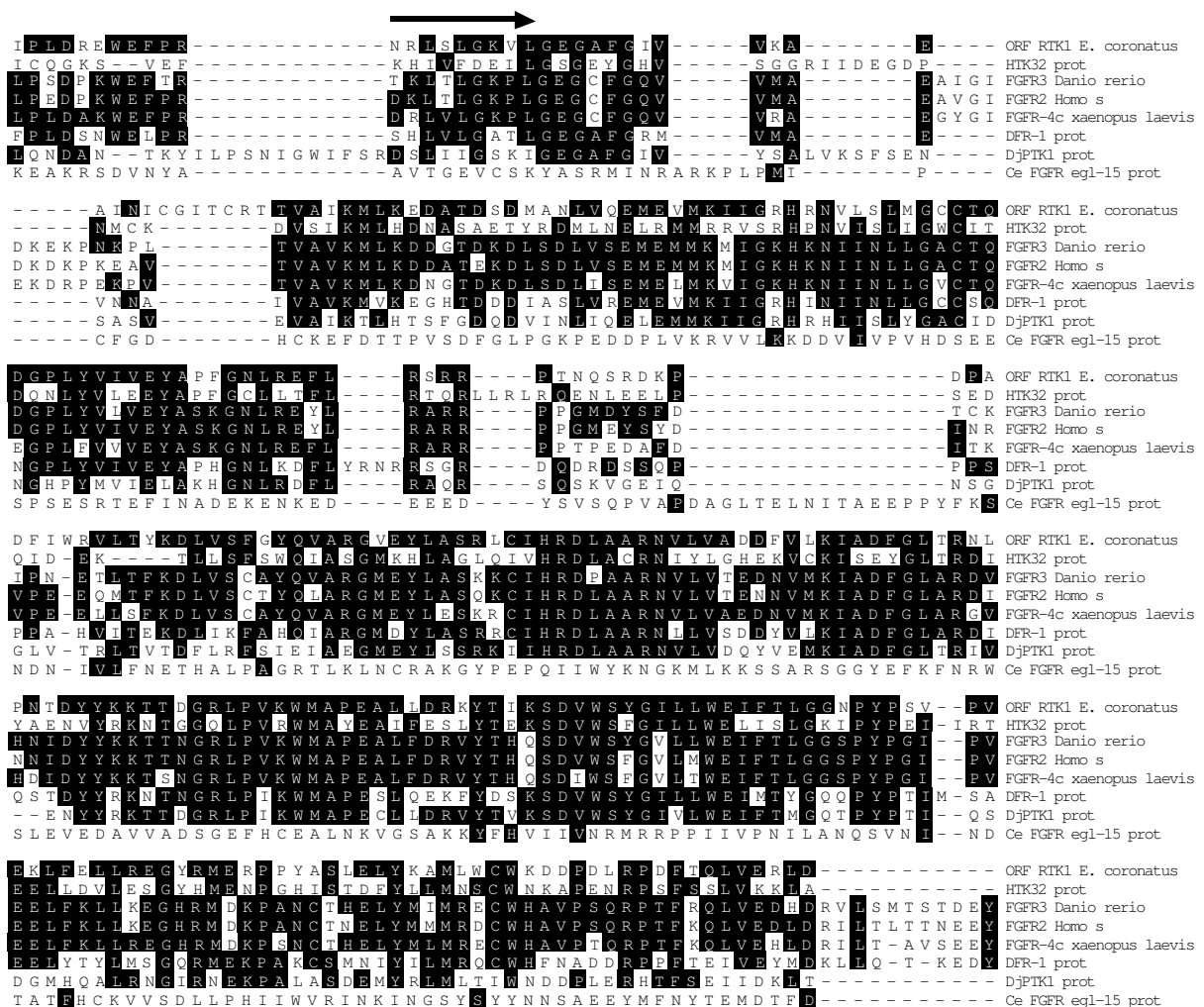


Abb. 4.4.: RTK1 und Heartless homologe Proteine. Sequenzvergleich des Bereichs, der die TyrK-Domäne umfasst. Die Pfeile zeigen Beginn (→) und Ende (←) der TyrK-Domäne. Folgende Proteine sind aufgeführt: RTK1 (*E. coronatus*), Heartless/DFR 1 (*D. melanogaster*), HTK32 (*Hydra vulgaris*),

FGFR3 (*D. rerio*), FGFR2 (*H. sapiens*), FGFR-4c (*X. laevis*), PTK1 (*Dugesia japonica*) und FGFR egl-15 (*C. elegans*).

Die möglichen Proteinsequenzen, die von der cDNA kodiert werden könnten, wurden über die NCBI-BLAST Datenbank auf Homologien untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die aus der cDNA abgeleitete Proteinsequenz eine Homologie von 40 % zu anderen Heartless-Homologen aufweist. Innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne (TyrK-Domäne) lag die Ähnlichkeit bei über 60 % (Abb. 4.4.).

Genauere Analysen ergaben, dass die isolierte cDNA eine Fusion zweier verschiedener unvollständiger cDNA-Fragmente ist. Sie enthält den 3'-Bereich einer RTK, mit höchster Homologie zu Vertebraten-FGFR und *Drosophila heartless*, sowie eine weitere Sequenz, die in Sequenzanalysen keine Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen ergab. Die Fusionsstelle ist durch das Auftreten der beiden cDNA-Adapteroligonukleotide gekennzeichnet, über den die cDNAs in den Vektor kloniert worden sind (Abb. 4.5.). Der 1,1 kb große Bereich der eindeutig einer RTK zuzuordnen war, wurde als spezifische Sonde für weitere Durchmusterungen der cDNA-Bibliotheken eingesetzt. Auf diese Weise gelang es jedoch nicht, weitere cDNA Fragmente zu isolieren.



Abb. 4.5.: Übersicht über die bislang isolierten cDNA. Der rot gekennzeichnete Bereich zeigt die RTK homologen Sequenz. Der blaue Bereich entspricht dem fusionierten cDNA-Fragment. Die Adapter-Oligonukleotide sind mit einem Pfeil markiert.

Um weitere Informationen zu erhalten, wurde mit dem RTK-Anteil des isolierten cDNA-Fragments Northern und Southern Blot Analysen durchgeführt.

4.4. Northern-Blot und Southern-Blot Analyse von RTK1

4.4.1. Northern-Blot

Um die Expression des RTK1-Gens zu überprüfen, wurde embryonale RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen (3.27.). Mit einer radioaktiv markierten RTK1-cDNA Sonde wurde die Membran hybridisiert. Weiterhin gibt die Northern Blot Analyse noch Aufschluss über die mögliche Länge des vollständigen Transkripts (Abb. 4.6.).

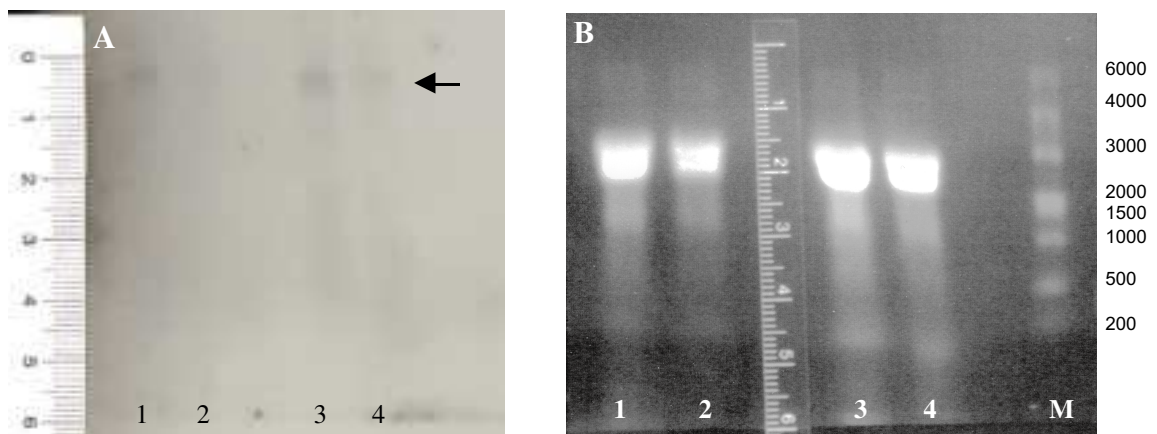


Abb. 4.6.: Northern Blot mit RTK1. (A) Autoradiographie. (B) Gelbild. Es wurden zwei RNA-Präparationen aus embryonalem Gewebe durchgeführt. Diese wurden gleichmäßig in je 2 Bahnen verteilt. RNA-Präparation Nummer 1 befindet sich in Spur 1 und 2. Die RNA Charge 2 wurde auf die Spuren 3 und 4 verteilt. Es wurden 15 µg Gesamt-RNA pro Bahn aufgetragen. Als Marker wurde der RNA-Ladder-Mix von MBI verwendet.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass das Transkript eine Größe von etwa 6 kb hat. Weitere Spleißvarianten sind nicht sichtbar.

Da die längste bisher bekannte cDNA 1,1 kb groß war, wurde über PCR-Techniken versucht, eine vollständige cDNA zu amplifizieren (4.5.).

4.4.2. Southern-Blot Analyse

Auch die Methode der Southern-Blot Analyse kann zur Verifizierung des isolierten Genfragments herangezogen werden. In der hier vorliegenden Arbeit gelang es, diese molekularbiologische Methode für *E. coronatus* zu standardisieren. Die Problematik dieses Versuchs bestand in der haploiden Genomgröße von *E. coronatus*, welche mit zirka 4×10^9 bp für das haploide Genom zwischen der Genomgröße von *D. melanogaster* und *H. sapiens* liegt (pers. Mitteilungen, A. Paululat). Dies erfordert eine große Menge an Gesamt-DNA für das Experiment.

Es wurde auf diese Weise gezeigt, dass das isolierte cDNA-Fragment auch im Genom von *E. coronatus* vorhanden ist (Abb. 4.7.). Eine Kreuzhybridisierung des Fragments mit genomischer DNA von *D. melanogaster*, die zur Kontrolle mit aufgetragen wurde, konnte nicht beobachtet werden.

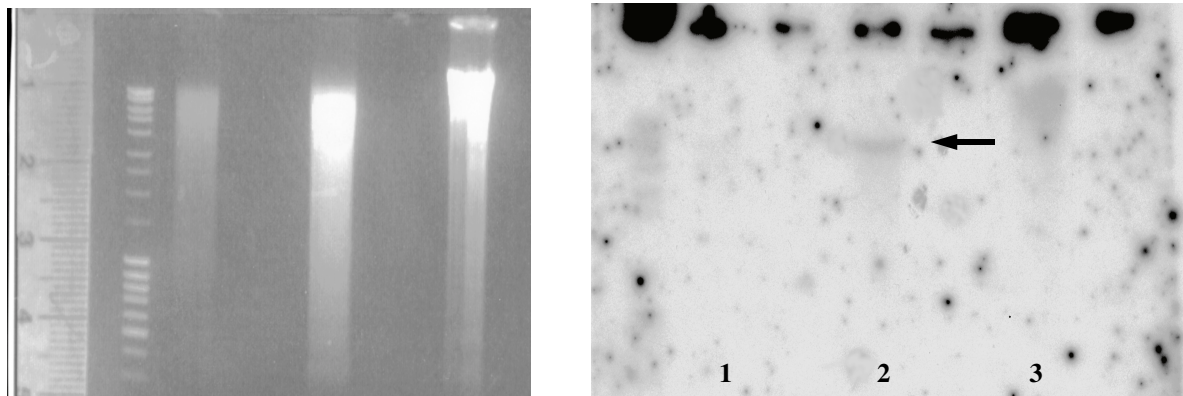


Abb. 4.7.: Southern Blot mit RTK1. (A) Gelbild. (B) Autoradiographie. In Spur 1 befinden sich 15 µg genomische DNA von *D. melanogaster*. Spur 2 ist mit 15 µg genomischer DNA von *E. coronatus* beladen worden. Beide Proben wurden mit dem Restriktionsenzym *Pst* I behandelt. Die letzte Spur (3) zeigt 15 µg unbehandelte genomische DNA von *E. coronatus*. Als Längenstandard wurden 4 µl des Mix-Ladder-Markers aufgetragen.

4.5. Vervollständigung der partiellen RTK1-cDNA mit Hilfe von PCR-Techniken

Wie die Northern-Analyse folgern lässt, enthielt die bislang isolierte cDNA keine komplette Gensequenz. Weiterhin konnte mit den genannten Methoden kein vollständiger offener Leserahmen gefunden werden. Da die Bibliotheken mit Hilfe von Poly-dT-Oligonukleotiden generiert wurden, konnte man davon ausgehen, dass die überragende Mehrzahl der cDNAs ihr natürliches Poly-A-Ende beinhalten und somit in 3'-Richtung komplett waren. In Folge dessen wurden Versuche durchgeführt, die es ermöglichen sollten, das fehlende 5'-Ende von RTK1 zu isolieren und die Sequenz zu analysieren.

4.5.1. Erststrangsynthese

Zunächst wurde die dafür benötigte cDNA aus embryonaler RNA wie beschrieben hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Varianten der Erststrangsynthese verwendet. Bei der ersten wurde ein Oligo-dT-Synthese-Oligonukleotid (5'-CDS) eingesetzt und jede mRNA revers transkribiert. Für die zweite Charge von Erststrangsynthesen wurde ein aus der RTK1 Sequenz abgeleitetes Oligonukleotid, RTK1 1st Str., verwendet. Mit diesem Oligonukleotid wurden nur mRNAs revers transkribiert, die eine komplementäre RTK Sequenz beinhalten. Die spezifische Erststrangsynthese wurde vornehmlich für die Amplifikation schon bekannter Sequenzen von RTK1 benutzt, um eine durchgängige cDNA zu amplifizieren.

Ausgehend von den Erststrangsynthesen, die mit dem nicht spezifischen Oligonukleotid hergestellt wurden, wurden darüber hinaus erfolgreich Fragmente anderer Gene von *E. coronatus* amplifiziert (Paululat, pers. Mitteilung).

4.5.2. RACE-PCR

Zunächst wurden die neu hergestellten cDNA-Synthesen mit internen Oligonukleotiden überprüft, ob die fragliche cDNA in der vorliegenden Charge vorhanden ist (Abb. 4.8.). Mit einem Adapter-Oligonukleotid, das bei der Synthese an das 5'-Ende ligiert wurde sowie einem

genspezifischen internen Oligonukleotid wurde die 5'-RACE-PCR durchgeführt. Bei diesen Versuchen konnten mehrere cDNA-Fragmente von *rtk1*, die aufgrund überlappender Sequenzen eine Gesamtlänge von 3,1 kb ergeben, isoliert werden. RACE-PCR Versuche, die über diesen Bereich hinausgingen, zeigten kein Ergebnis.

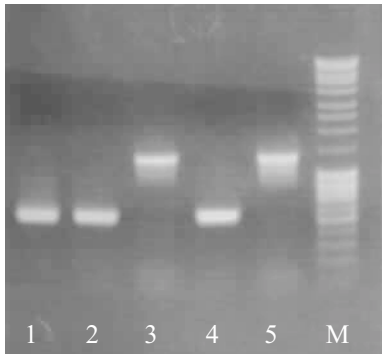


Abb. 4.8.: Kontrolle zweier unterschiedlicher Erststrangsynthesen mit internen Oligonukleotiden. Die Positivkontrolle in Spur 1 zeigt eine PCR mit einem bereits klonierten Fragment als Matrize und den Oligonukleotiden RTK1 Fw2 und RTK1 Rv4. 10 µl eines 50 µl Ansatzes wurden analysiert. Spur 2-3 und 4-5 zeigen zwei verschiedene Erststrangsynthesen, die ebenfalls mit den Oligonukleotiden überprüft wurden. In Spur 3 und 5 wurden die Oligonukleotide RTK1 Fw4 und RTK1 Rv4 zur Amplifikation benutzt. Als Größenstandard wurde der Mix-Ladder-Marker benutzt.

In der assemblierten 3,1 kb großen cDNA konnten mit Hilfe der EMBL-Datenbank SMART mehrere konservierte Domänen vorausgesagt werden. Außer der bereits schon bekannten Tyrosin-Kinase-Domäne (TK-Domäne) wurden noch folgende Domänen erkannt (Abb. 4.9.): eine Transmembran-Domäne (TM-Domäne) und zwei Immunglobulin-Domänen (IG-Domänen). Im 3'-Bereich konnte kein Poly-A-Signal und keine Poly-A-Sequenz identifiziert werden. Das 3,1 kb große Transkript besaß einen Bereich, der sich als nicht eindeutig sequenzierbar erwies (Abb. 4.9.;4.10.). In mehreren unabhängigen RACE-PCR Experimenten wurde dieser Bereich mit flankierenden Oligonukleotiden amplifiziert. Als Matrize dienten Erststrangsynthesen, die für die hier vorgenommenen PCR-Experimente jeweils neu synthetisiert wurden. Die Sequenzen der Amplifikate zeigten keinen Konsensus innerhalb dieses ca. 200 bp großen Bereichs (Abb. 4.9.).


```

ACGCGGGGAATGAATAGAGGCCACAAGCACTTACATATTTTCACTTTACAACAATGCCGATCTAATATGCGAGTACAGGAGACATGTTACCAACAGCA 100
GGAGACTAAAATAAAGCTAAAAAAC TGGCAATTATAAATAGCTTAAATACAATGGCAGACATTAACATCTTGTAACTTTTTAGTTTTGATATTT 200
TTATTAAAGCTAATTTATAAAGGCTAAAGACGAGTTTAAATAGCGGTTGCCATTTTCGAGGCAATAAATGTCGAGCGATCCAGGATTCGCACCGCGCAC 300
CTACGGAACCGCAGCTGAGACTCCTAACCAAGTGTGATATGCGGCTCTGTCTATAATGCTATCATTAAATCATTAGAAACATATTTAATGCATACCTTTTGT 400
GTATTTTGAATTATTTTTCATAAAATTTGATTGATTGATTGATTGATTGATCAATCAATACCGGCAGGAGCCAGTAGTGCAGTCCGGTTAAGTGTCTGACTGC 500
GGATCAGTATGTGTGGGTTCAAATCCGAGGCTCGCCTGTCACTGATATCTTTTGGAGAGATTAACCTGACGTTAACATCGGCCTTTTGCCTTTTGTATTTA 600
ATGATTGATTGAATTGAAAGAGGATAGTGACACAGCCAGAGAGAAGGAGGTGGAATATTTTGTAGAGGTCCAGCACGCTGGTACGGACCTGGAACCTCAAT 700
. . . . L K E D S D T A R E K E V E Y F V E V Q H A G T D L E L K
GTCCAACAGGTAGGACACCGGATCGGAATGTTACCTGGATCAAGAATGGATCACCTTTACCGGAAGGGCTTCCTCTGCCAAGGTGAAGTGGATCACAAG 800
C P T G R T P D R N V T W I K N G S P F T G R A S S A K V K W I T R
AAAGGCAAACTTTGTCTGAGGTTTCGACTCCGCGGTGCTCTAGACAGTGGTAACAACGCATATGTGGTGGAGTGGGGAGGTCCAGGCCAGGCAGTGGAGG 900
K A N F V L R F D S A V L S D S G N N A Y V V E W G G Q A R Q W R
TACTTCGACGTTAGAATTATACCGATGTACCCTACAAGCTGTGATCACGGATGGTCCCTCAACCAGACCTGCTGGTGGGGAGGTGGCGAGGTTGC 1000
Y F D V R I I P M Y P Y K P V I T D G P L N Q T L L V G E V A R F
AGTGCCATCATCAGICGACGCTCAGCGTACTTCCAGTGGCTCAAGCAATTACCTCATTAATGGCTCCACCACAACGAGTCCGACCATGATTCTCCATA 1100
E C H I I S D A O P Y F Q W L K H Y L I N G S Y H N E S D H D S P Y
TGTGCATGTACTGAAGAGTGTGGACGGGTAACATAACGTCAACATGGAGGTGCTGCTCATCAACAACCTAACGCTGGACGATACAGGCTGGTACACC 1200
V H V L K S D G R V N I T S N M E V L L I N N L T L D D T G W Y T
TGATGGTGGGAACTTTATGGGTCTAGGCTTCAAACACGCTACCTCACTGTCAACAACCTCCGGCAGCCTTCTCTTGGCAGTGACAGAAGACGAAACGG 1300
C M V G N F M G L G F K H A Y L T V T T P A A S S L A V T E D E T
ACAAGCACAGATCCAACCTAACCACTCAACCGTTATTATCTCTATCGCCTGTGTCTGTATACAGTCTTACCCCTGCTGCTAGTGCCTGCTGCTTCT 1400
D K H R S N L T T S T V I I S I A C V C I T V F T L L L V L C C F I
TCGCTTCACTCCATCAACCTCGCACTCTTGGATCTCAAACCGGCTGCCAGGCGACGTCGTGGTTCATGCGTACTAACGTAAGTGTACCTAAGTCACTC 1500
R F T P S T S H S W I L K P A A R R R V V V M R T N V L Y P N S S
AAGCACTTCGGCTACACAGGGGACCTCATGACCCCTGCTGGCCAGGTAGAAATTGAGGGGGGCGGAAGGATGGTGGGGGATGGTACCCGGTTA 1600
K H F G V P Q G T L M T P L L A Q V R I E G G G R M V G D G T P V
GCGCATTGAGTATGAGATCCGTTAGATAGGGAGTGGGAGTTCCTCAAGAAACAGGCTATCAC TAGGTAAGGTGCTAGGAGAAGGAGCCTTTGGTATCGT 1700
S A F E Y E I P L D R E W E F P R N R L S L G K V L G E G A F G I V
AGTGAAGGC TGAAGCCATCAATATTTGTGGCATCACGTGTCGAACCTGTGGCCATTAAATGCTAAAGAAGAGCGCACGGACAGTGACATGGCAAC 1800
V K A E A I N I C G I T C R T T V A I K M L K E D A T D S D M A N
CTTGTCACAGGAGATGGAAGTGATGAAGATTATTGGTCGTATAGAAACGTGCTGAGTCTAATGGGCTGCTGTACACAGGATGGTCTCTGTACGTGATCG 1900
L V Q E M E V M K I I G R H R N V L S L M G C C T Q D G P L Y V I
TCGATATGCTCCCTTTGGTAACCTCAGAGAGTTTTTGGAGTCAACGACCTACAACCAAGTCAAGTCAAGGCTGACCGACGAGCTTATCTGGCG 2000
V E Y A P F G N L R E F L R S R R P T N Q S R D K P D P A D F I W R
AGTGTAACTGATATAAGATCTCGTATCGTTTGGTTACAGGTGGCGGAGGTGTCGAGTATCTCGCTTCTAGACTGTGCATACACGGGATTTGGCTGCC 2100
V L T Y K D L V S F G Y Q V A R G V E Y L A S R L C I H R D L A A
AGGAACGTTCTAGTCGCGATGACTTTGTGCTGAAGATCGCAGACTTTGGTTTAAAGAGAAACCTTCAAATACAGACTACTACAAGAAAACACCGATG 2200
R N V L V A D D F V L K I A D F G L T R N L P N T D Y Y K K T T D
GACGCTGCGCGTGAAGTGGATGGCGCCGGAGGCACGTCGGACAGAAAGTACACCATCAAGAGCGATGTGTGGTCTACGGGATCTGTGTGGGAGAT 2300
G R L P V K W M A P E A L L D R K Y T I K S D V W S Y G I L L W E I
ATTACACTCGGAGGAATCCCTATCCCTCAGTCCCGGTGGAGAACTGTTTGAAGTCTGAGGGAGGGATACCGAATGGAAGACCTCCCTATGCCTCA 2400
F T L G G N P Y P S V P V E K L F E A L L R E G Y R M E R P P Y A S
CTTGAATATATAAGGCCATGCTGTGGTGTGGAAGGATGATCCAGATCTTAGGCTGACTTCAACCGAGCTAGTTGAGAGGCTGATCAGATGCTCTCCT 2500
L E L Y K A M L W C W K D D P D L R P D F T Q L V E R L D Q M L S
TATCTGTACAGAGAATTACCTCGAGTTGGACTCCAAGGTGGAGACATCTGGTGAATCACGCGTAGTGCACAATCAGTATCTTGTATGTCAACAAGCAA 2600
L S V T E N Y L E L D S K V E T S G E S R V V D N Q Y S C M S T S N
CAGCAGCAATCAACCTGATGGCTCAGCACTAAACAGCTGCAATACGACTTTAATTACTGAATTTAACTTTAACTAAGTGGTCAATCCATATTACGTCA 2700
S S N Q P D G S A L N S C N T T L I T E F K L
TTATAGGGCTCGATGACGTCATTAATAATAAATAATTACACACCTTTTGTTTAAACCGCAAAATCCGCCACAAATTGTGCGGACACTACCAAAATGCTA 2800
CAAAAGTTAACTTTAATAACAACCTTTTGCTTACTATCTATTTGAAAACTGTCTCAGAAAATTACGAAAAATCATAATATTTTGTCTGCTGAATTTCTC 2900
TGTAACCTTTGCATACAGCTTCGTTATCTCTACACACACAATCTCTGGTGACCGACTGAGCCCTACCCAGAACTGGTGACCGACTCAGGGGTTATCGAA 3000
GACCAATCCGAGTGATAACAGCATCGAGTGGGGGGGGGAGCTTGCAGAAAATCAAGACGTAATATTTGAATGGTCCATAGTGCCCTCACTGCAGACTTT 3100
ATCTGAATTTTAATTTATAT3120

```

Abb. 4.9.: Sequenz der über RACE-PCR isolierten cDNA von *rtk1*. Der größte gefundene Leserahmen umfasst 2 kb. In rot ist die Tyrosinkinase-Domäne hervorgehoben. Die Transmembran-Domäne ist blau und die IG-Domänen grün unterlegt. Der nicht eindeutig zu sequenzierende Bereich wurde unterstrichen, der mit 1-1 markierte Bereich zeigt den Bereich, der durch beim Durchmustern isoliert wurde.

Experimente, um mit aufgereinigter DNA aus den cDNA-Bibliotheken den gesuchten Bereich zu amplifizieren, brachten kein Ergebnis. Auch in zusätzlichen Ansätzen über RT-PCR konnte kein

weiteres Fragment amplifiziert werden. Weder konnte ein weiter 5'-liegendes Fragment amplifiziert werden, noch gelang es den kritischen Bereich mit den gefundenen Amplifikaten eindeutig zu bestimmen.

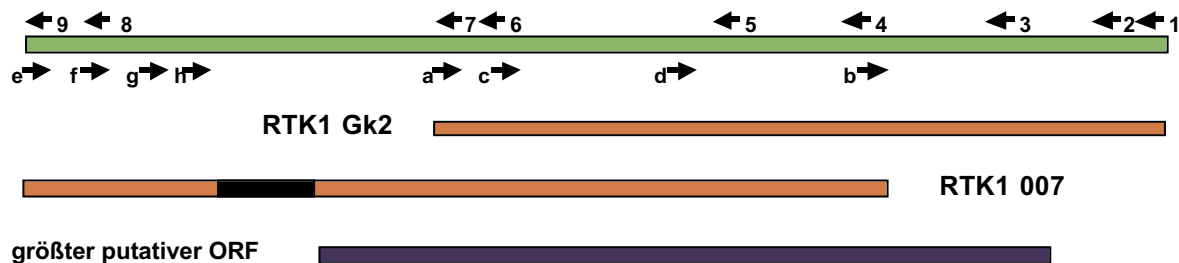


Abb. 4.10.: Übersicht über die durch RACE-PCR entstandenen Fragmente. Der obere Balken zeigt den gesamten bisher isolierten Bereich von 3,1 kb. Hier sind die zur RACE verwendeten Oligonukleotide eingetragen. Die Klone RTK1 Gk2 und RTK1 007 sind exemplarisch aufgeführt für Fragmente, die durch RACE-PCR amplifiziert wurden. Der dunkle Bereich des Klon RTK1 007 zeigt den kritischen Bereich an, der keine eindeutige Sequenz ergab. Die für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide sind im folgenden aufgeführt. (1) RTK1 Rv 5, (2) RTK1 Rv 14, (3) RTK1 1st Str., (4) DRF1 Rv 4, (5) DRF1 Rv 2, (6) RTK1 Rv 8, (7) RTK1 Rv 7, (8) RTK1 Rv 12, (9) RTK1 Rv 11, (a) RTK1 Fw 4, (b) DRF1 Fw 3, (c) RTK1 Fw 5, (d) DRF1 Fw 2, (e) RTK1 Fw 7, (f) RTK1 Fw 8, (g) RTK1 Fw 9, (h) RTK1 Fw 6.

4.6. Sequenzvergleich *rtk1*-orthologer Gene

In der isolierten cDNA konnte ein unvollständiger offener Leserahmen gefunden werden, der eine Länge von 687 Aminosäuren besitzt (Abb. 4.10.). Datenbankanalysen zeigten, dass die größte Homologie von RTK1 auf Proteinebene bei *D. melanogaster* Heartless und den entsprechenden Homologen anderer Spezies vorhanden war (Abb. 4.11.). Die meisten Proteine dieser Gruppe besitzen eine Länge von 700 bis 800 Aminosäuren (Tab. 4.2.). Hierbei fällt auf, dass der offene Leserahmen von RTK1 mit 687 Aminosäuren eine kurze Proteinsequenz darstellt. Bei Vergleichen der konservierten Domänen der Gen-Familie ist festzustellen, dass alle Mitglieder der Familie über eine Tyrosinkinase-Domäne, eine Transmembran-Domäne sowie über 2 bis 3 Immunglobulin-Domänen (IG-Domänen) verfügen. Im offenen Leserahmen von RTK1 befindet

sich eine Tyrosinkinase-Domäne (Abb. 4.15.). Es konnte ebenfalls eine Transmembran-Domäne und 2 IG-Domänen nachgewiesen werden.

Protein	Organismus	Größe (AS)
Heartless	<i>D. melanogaster</i>	729
HTK32	<i>Hydra vulgaris</i>	752
FGFR3	<i>Danio rerio</i>	800
FGFR2	<i>Homo sapiens</i>	821
FGFR-4c	<i>Xenopus laevis</i>	828
PTK1	<i>Dugesia vulgaris</i>	666
FGFR egl-15	<i>C. elegans</i>	1040
Ec RTK1 partiell	<i>E. coronatus</i>	687 (bisher)

Tab. 4.2: Größenvergleich einiger Mitglieder der Familie der *FGFRs*.

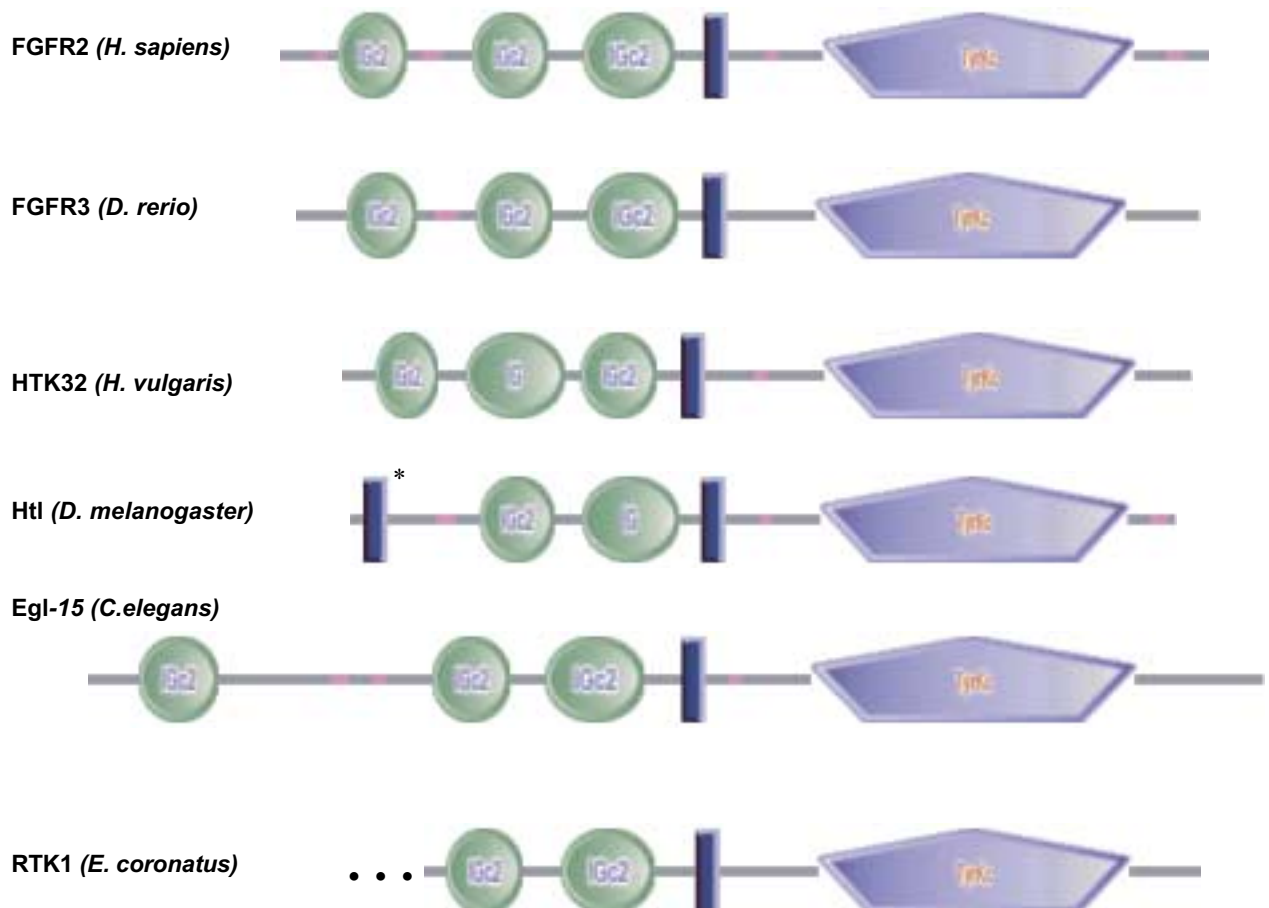


Abb. 4.15.: Überblick über die Proteine mit den konservierten Domänen der FGFR Familie. Dabei stehen IG für Immunglobulin-Domäne und TyrKc für Tyrosinkinase-Domäne. Transmembran-Domänen werden durch ein blaues Rechteck symbolisiert. Die mit einem * markierte Transmembran-Domäne ist nicht funktionell, sondern nur vorhergesagt. Sämtliche Domänenvorhersagen wurden mit dem Analyseprogramm SMART (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2002) durchgeführt.

Im Bereich vor der ersten IG-Domäne befindet sich ein Abschnitt, der nicht eindeutig sequenzierbar war. So konnte bislang noch kein Startkodon in diesem Bereich identifiziert werden, das sich im richtigen Leserahmen befand. Gründe hierfür sind auf Sequenzierfehler oder Erststrangsynthesefehler zurückzuführen. Mehrmalige Amplifikation dieser Sequenz aus unabhängig hergestellten Erststrangsynthesen oder präparierter Phagen-DNA der cDNA-Bibliotheken und auch eine erneute Durchmusterung der Bibliothek konnte dieses Problem nicht lösen.

4.7. Phylogeniebetrachtungen von RTK1

Bereits durchgeführte Phylogenie-Betrachtungen zeigen, dass die FGFRs eine eigene Familie bilden, wobei die 4 Vertebraten FGFRs paraloge Gene darstellen, genauso wie die beiden FGFRs von *Drosophila* (Coulier *et al.*, 1997). Um zu verifizieren, dass die RTK von *Enchytraeus coronatus* in die Familie der FGFRs gehört, wurde ein Phylogenievergleich der vollständigen Aminosäuresequenzen 21 verschiedener Invertebraten Tyrosinkinasen, den Maus FGFRs und dem FGFR von *Branchiostoma lanceolatum* durchgeführt. Dieser Vergleich wurde nach der „neighbour-joining“-Phylogenie erstellt (Felsenstein, 1981). Mit Hilfe entsprechender Phylogenie-Programme (ClustalX, PAUP) konnte ein Stammbaum aufgestellt werden.

Aus dem Stammbaum ist ersichtlich, dass RTK1 der Gruppe der FGFRs zugeordnet werden kann. Dabei steht das Gen den Vertebraten näher als den Vertretern der Invertebraten, wie *D.m. heartless* oder *C.e. egl-15*.

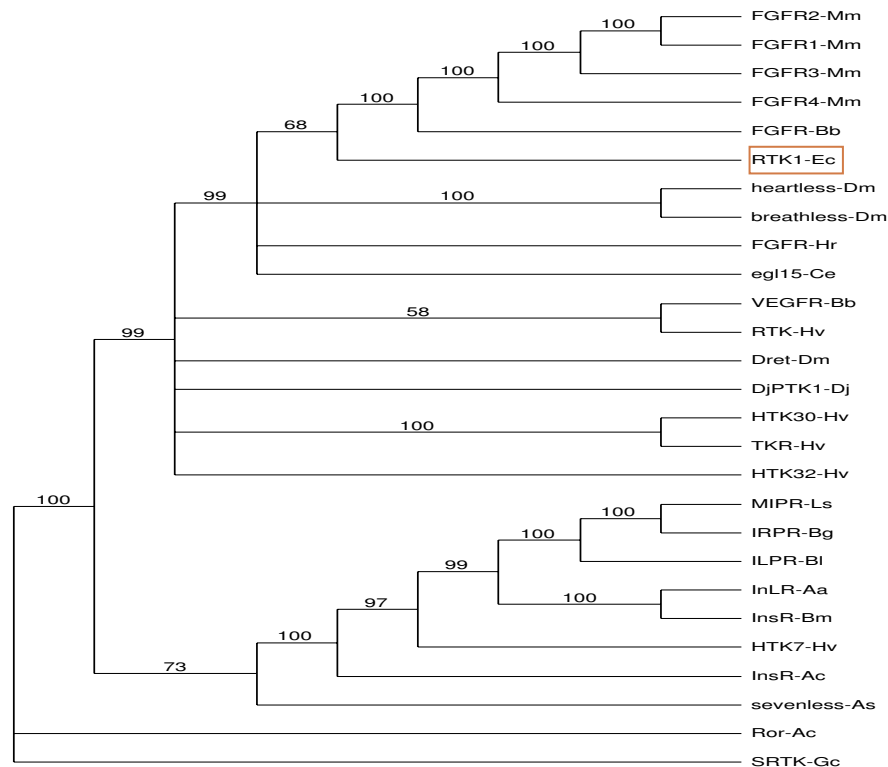


Abb. 4.16.: Phylogenie verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen nach der neighbour-joining Methode. Als Außengruppe wurde eine RTK von *Geodia cydonicum* (SRTK-Gc; Porifera) definiert. Die Zahlen sind Prozentangaben der bootstrap replicas (in % von 1000, Hedges, 1992). Sämtliche Sequenzen sind Genbank entnommen. FGFR2-Mm: Nm_010207, FGFR1-Mm: S17295, FGFR3-Mm: NPO32036, FGFR4-Mm: S18209, FGFR-Bb: BAA4727, *heartless*-Dm: XP_082187, *breathless*-Dm: AAF49759, FGFR-Hr: BAB59007, egl15-Ce: Q10565, VEGFR-Bb: BAA84747, RTK-Hv: AAA65223, Dret-Dm: BAA21836, DjPTK1-Dj: JE0201, HTK30-Hv: T31329, TKR-Hv: AAA68205, HTK32-Hv: AAD28442, MIPR-Ls: Q93105, IRPR-Bg: AAF31166, ILPR-BI: OO2466, InLR-Aa: Q93105, InsR-Bm: AAF21243, HTK7-Hv: Q25197, InsR-Ac: 2207309A, *sevenless*-As: BAA32407, Ror-Ac: AAK25726, SRTK-Gc: CAB38028.

4.8. RTK1-spezifische *in situ* RT-PCR an Gewebeschnitten

Diese Methode ist eine Kombination von Hybridisierung und RT-PCR. Mit ihr ist es möglich, eine PCR direkt im Gewebe durchzuführen. Dies wird an Gewebe-Dünnschnitten durchgeführt, die hierfür speziell präpariert werden. Da bislang noch keine Färbung in *in situ* Hybridisierungen nachgewiesen werden konnte, wurde diese Methode als Alternative zu den Standardprotokollen durchgeführt (s. Diskussion). Der Vorteil dieser Methode ist, dass fast alle Techniken, die hierfür

notwendig sind, wie zum Beispiel RT-PCR und Erststrangsynthese bereits an *E. coronatus* erfolgreich durchgeführt wurden. Die Anwendung dieser Methoden musste auf Paraffin-Schnitte übertragen werden.

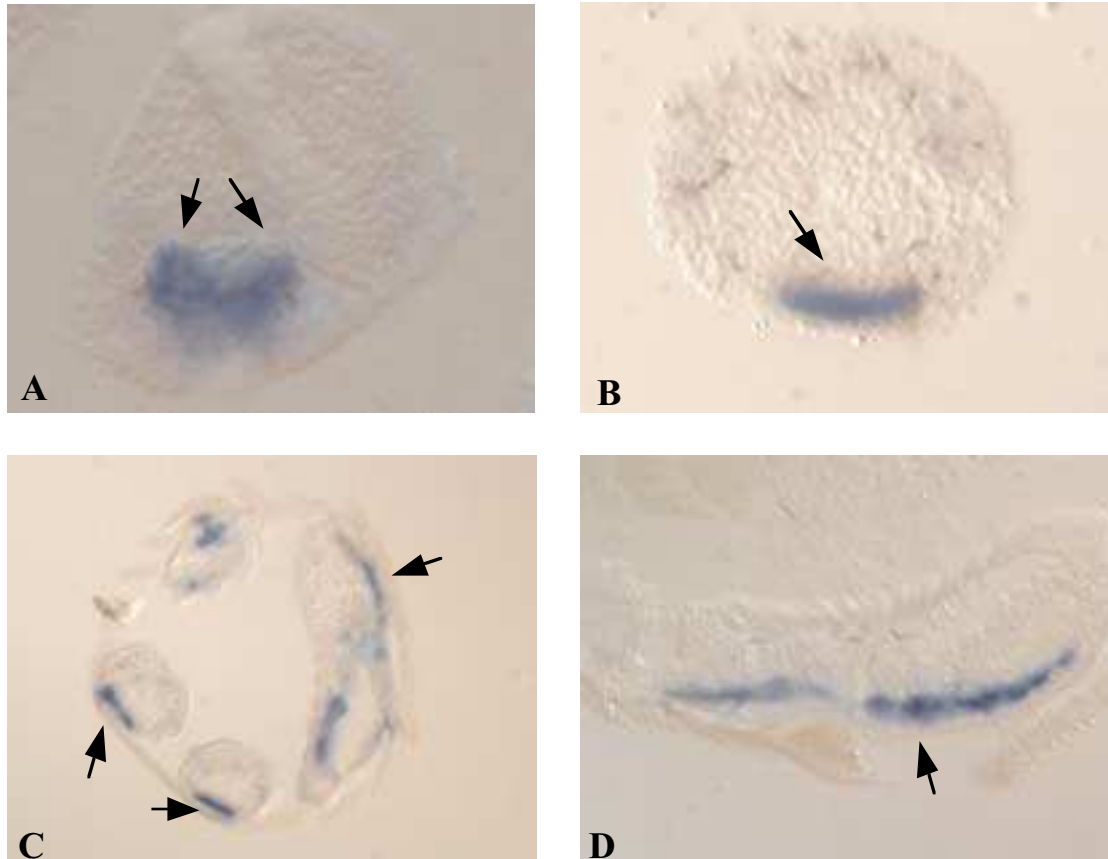


Abb. 4.16.: *In situ* RT-PCR an Schnittpräparaten mit DIG-markierten Oligonukleotiden. Für die PCR wurden die Primer RTK1 Fw 4 und RTK1 Rv 2 benutzt. (A) Querschnitt eines Tag 5 Embryos. Man erkennt die fast vollendete Umwachsung des Ektoderms. Gefärbt ist das sich ausdifferenzierende Nervensystem (Pfeile). (B) Tag 6 Embryo. Das Ektoderm ist verschmolzen und das angefärbte Bauchmark (Pfeil) ausdifferenziert. (C) Verschiedene Stadien, mit markiertem Nervensystem (Pfeile). Querschnitte und auch Längsschnitt. (D) Längsschnitt durch einen Tag 7 Embryo. Auch hier ist das Nervensystem markiert (Pfeil).

Die für die PCR benutzten Reagenzien und das PCR-Protokoll wiesen einen hohen Toleranzbereich auf. Dies war notwendig, da die Bedingungen, unter denen die PCR im Gewebe ablief, nicht abgeschätzt werden können. Unter diesen Bedingungen war es zunächst möglich, eine spezifische Färbung im Nervensystem zu erreichen (Abb. 4.16.). Die erste Färbung konnte im differenzierenden Nervensystem erkannt werden und konnte durchgängig bis zum Juvenilen beobachtet werden. Aufgrund der nicht eindeutig verlaufenden Positiv- und Negativkontrollen

Die größten Homologien von RTK2 bestanden unter anderem zu dem *Drosophila melanogaster* *ret* Gen (Sugaya *et al.*, 1993) und *ret* Homologen anderer Spezies, wie zum Beispiel *Mus musculus* (Iwamoto *et al.*, 1993), *H. sapiens* (Takahashi *et al.*, 1988), *Xenopus laevis* (Grieco *et al.*, 1995), *D. rerio* (Marcos-Gutierrez *et al.*, 1997) und *H. vulgaris* (Reidling *et al.*, 2000). Dies war auffällig, da *ret* von *D. melanogaster* bei der Durchmusterung einer genomischen Bibliothek mit einer *heartless*-cDNA gefunden wurde (Sugaya *et al.*, 1993). Ebenfalls konnte eine geringere Homologie zu *breathless*, dem zweiten Vertreter der FGFR-Familie bei *Drosophila* nachgewiesen werden. Allerdings lag diese Übereinstimmung weit unter der Übereinstimmung mit RET-Proteinen (Abb. 4.17.). Genauere Analysen ergaben auch bei diesem Klon, dass eine Fusion von 2 unabhängigen cDNAs vorliegt. Durch den Einsatz des isolierten spezifischen *rtk2*-Fragments als Sonde für weitere Durchmusterungen war es möglich, 5 zusätzliche, unabhängige Klone für RTK2 aus den Bibliotheken zu isolieren (Tab. 4.3.). 3 dieser isolierten Klone waren ebenfalls Fusionsklone, die anderen beiden enthielten ausschließlich ein RTK2-cDNA Fragment.

Name	Größe	Bemerkungen
RTK1 1	2700 bp	Erste isolierte cDNA, Fusionsklon mit 1100 bp RTK1
RTK2 1	2900 bp	Mit RTK1-Sonde isolierte cDNA, Fusionsklon, 1800 bp RTK2 Sequenz
RTK2 4-1	1100 bp	
RTK2 4-2	2700 bp	Fusionsklon, 400 bp RTK2 Sequenz
RTK2 13	1200 bp	
RTK2 16	600 bp	
RTK2 19	3000 bp	Fusionsklon, 1600 bp RTK2 Sequenz

Tab. 4.3.: Übersicht über alle isolierten cDNA-Fragmente von RTK1 und RTK2

In weiteren Untersuchungen wurde RTK2 zunächst nicht berücksichtigt. Die homologen Proteine von Ret in den verschiedenen Spezies zeigen keinerlei bekannte Funktion bei der Entwicklung des Mesoderms oder bei der Bildung von Muskulatur, sondern sind bei Vertebraten Proto-Onkogene (Takahashi and Cooper, 1987). Bei *Drosophila* zeigt Dret eine frühe Expression in

Neuroblasten und eine spätere in Subpopulationen von Zellen des Nervensystems (Sugaya *et al.*, 1993). Die Bearbeitung dieses Gens wird daher zunächst zurückgestellt.

4.10. Antikörperfärbungen an *E. coronatus*

Antikörperfärbungen sind ein wichtiges Mittel, um Expressionsanalysen von Proteinen *in vivo* betreiben zu können. Aus diesem Grund war es notwendig, die Methode der Antikörperfärbung bei *Enchytraeus coronatus* einzurichten und zu standardisieren.

4.10.1. Antikörperfärbung mit Phospho-Histon PH3 Antikörper

Der Antikörper Phospho-Histon PH3 erkennt Histone in einem bestimmten Phosphorylierungszustand, wie er nur während der Mitose vorkommt (Juan *et al.*, 1998). Also werden nur Zellen, die sich in der Mitose befinden, markiert. Über einen geeignet markierten Zweitantikörper können diese sichtbar gemacht werden. In den Experimenten wurde der Erstantikörper in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt. Der mit alkalische Phosphatase gekoppelte Zweitantikörper wurde in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt

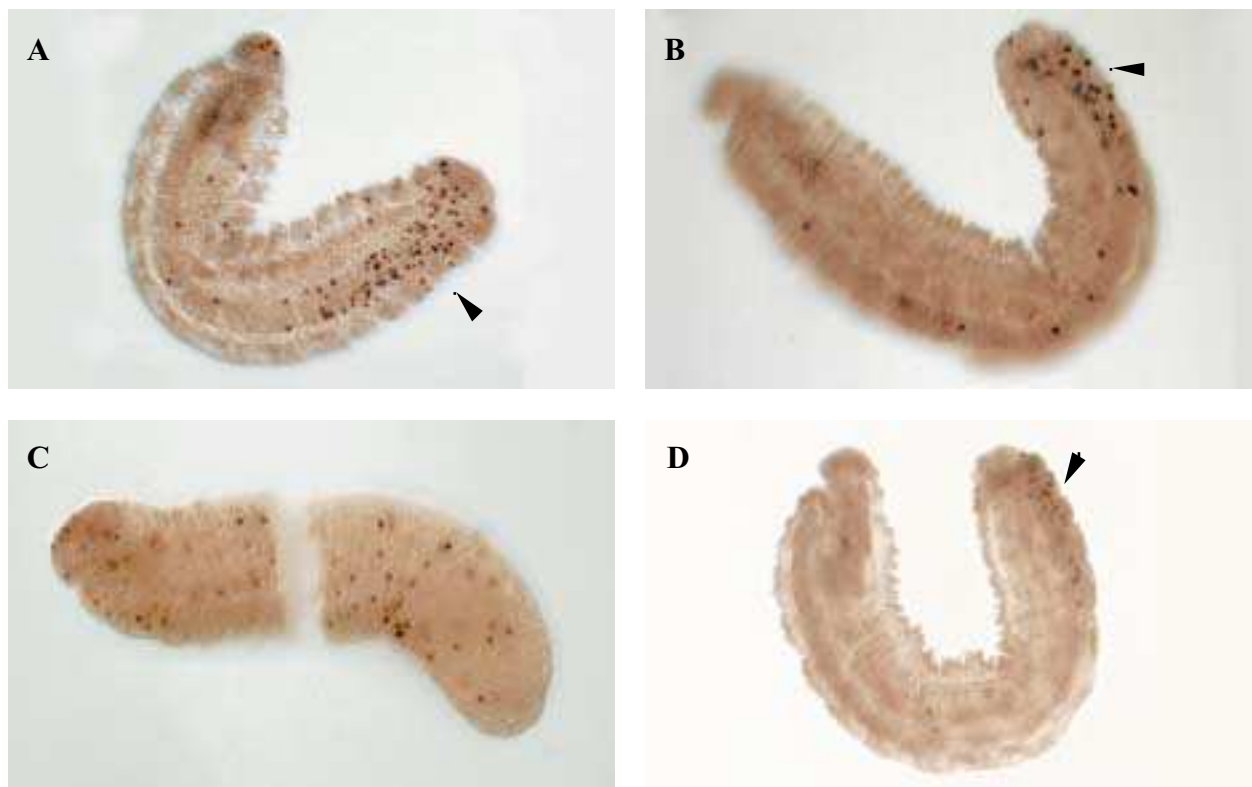


Abb. 4.18.: Antikörperfärbung mit Anti-Phospho-Histon Antikörper. Abbildungen (B)-(D) sind Lateralansichten, Abbildung (A) ist eine Ventralansicht auf einen 4 Tage alten Embryo. Abb. (C) zeigt einen 3 Tage alten Embryo. In Abb. (B) und (D) ist ein 6 Tage alter Embryo gefärbt worden.

Es konnten verschiedene Embryonalstadien betrachtet werden. Jüngere Stadien bis Tag 3 zeigten eine diffuse Verteilung (Abb. 4.18.C) der Mitosestadien. In älteren Embryonen konnte man eine erhöhte Mitoseaktivität am posterioren Ende erkennen (Abb. 4.18. A, B, D). Während der Embryogenese bildet sich bei *E. coronatus* am hinteren Pol eine Sprossungszone. Hier ist die Teilungsaktivität besonders hoch. Deswegen sind hier viele Mitosen zu beobachten. Die Anzahl der markierten Zellen nimmt ab, je weiter sich das Segment ausdifferenziert.

4.10.2. Antikörperfärbungen mit Anti-Tubulin (acetyliert) Antikörper

Dieser Antikörper detektiert acetyliertes Tubulin. Aufgrund des hohen Vorkommens dieses Tubulins vor allem im Nervensystem kann der Antikörper dort als Marker eingesetzt werden (Jellies *et al.*, 1996; Siddiqui *et al.*, 1989). Die Entstehung und die Entwicklung des Nervensystems kann mit diesem Antikörper sehr gut untersucht und verfolgt werden (Abb. 4.19.) . Somit kann er in weiteren Untersuchungen als Kontrollfärbung benutzt werden.

Der Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der Fluorescein-gekoppelte Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

In frühen Stadien kann man erste Färbungen in der Kopfreion beobachten (Abb. 4.19.A). Das Oberschlundganglion und das Unterschlundganglion sind die ersten nachweisbaren Strukturen in dieser Färbung. Das Nervensystem differenziert sich immer weiter nach hinten fort und bildet schließlich ein komplettes Strickleiternnervensystem (Abb. 4.19. C,D). In vielen Präparaten ist auch das Darmepithel angefärbt (Abb. 4.19. C). Auch das Tubulin des Hautmuskelschlauchs ist mit diesem Antikörper sichtbar zu machen (Abb. 4.19.B). Ebenfalls gefärbt ist der Samenleiter (Abb. 4.19.F). Eine große Anhäufung von Nervenbahnen findet sich im Prostomium (Abb. 4.19.E). Dies ist leicht verständlich, da das Prostomium unter anderem als olfaktorisches Organ fungiert.

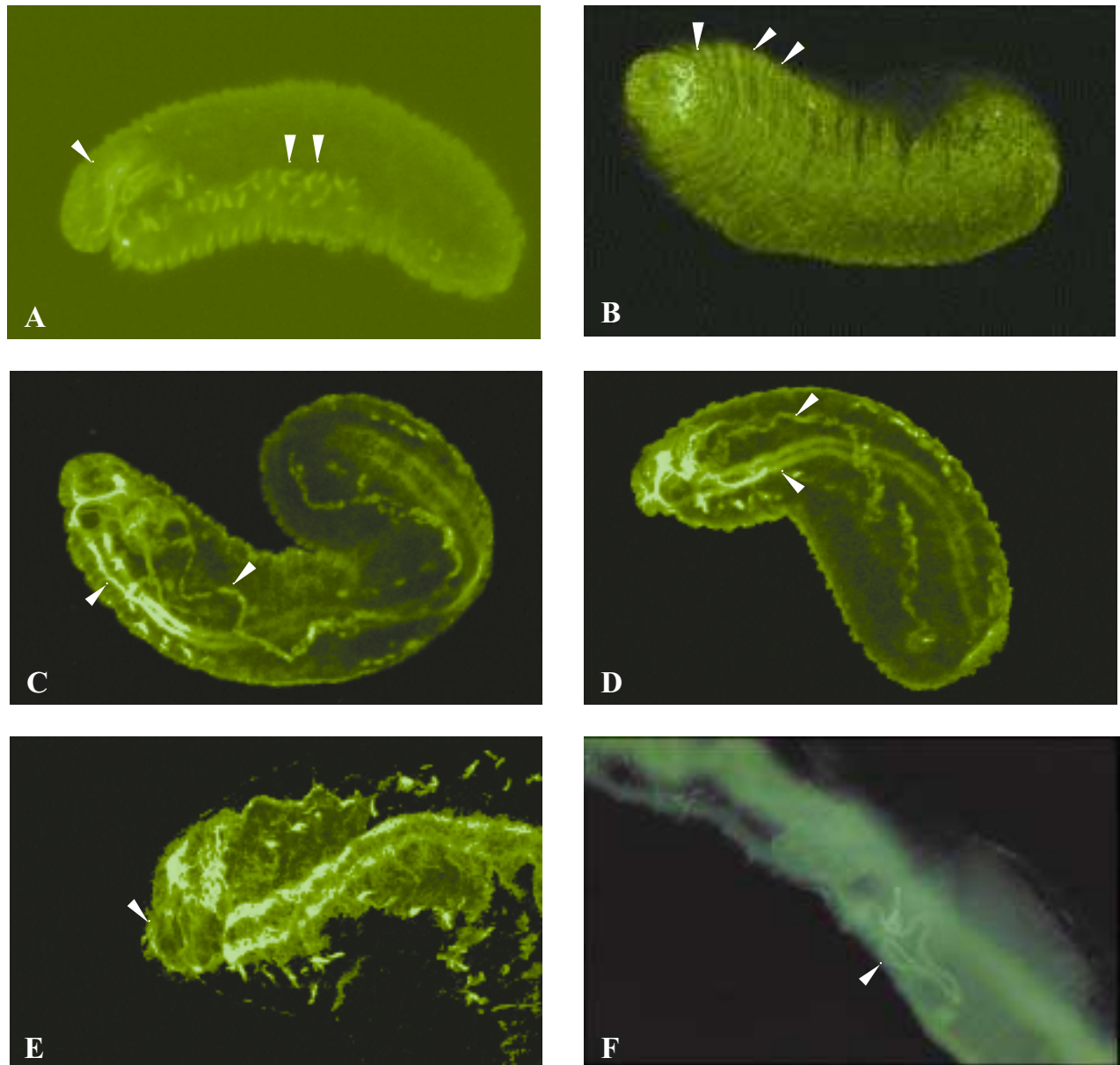


Abb. 4.19.: Antikörperfärbung mit Anti-Tubulin (acetyliert) Antikörper. (A) Lateralansicht eines frühen Embryos (Tag 3). (B) Ventralansicht eines älteren Embryos (Tag 4). Abb. (C) und (D) zeigen einen Tag 6 Embryo. In (E) ist eine Vergrößerung eines Prostomiums aus Tag 6 zu sehen. (F) zeigt den Samenleiter eines Tag 7 Embryos.

5. Diskussion

5.1. Konstruktion von cDNA-Bibliotheken aus *Enchytraeus coronatus*

In der vorliegenden Arbeit gelang es, mehrere embryonale cDNA-Bibliotheken herzustellen. Die hierfür notwendige Poly-A-mRNA wurde aus Embryonen aller Entwicklungsstadien von *Enchytraeus coronatus* isoliert. Da es zu Beginn der Untersuchungen noch nicht möglich war, eine ausreichende Menge an mRNA aus Embryonalstadien zu isolieren, wurde die PCR-basierte Generierung einer cDNA-Bibliothek favorisiert, welche lediglich die Bereitstellung von 50-80 ng Poly-A-mRNA erfordert. Allerdings erzielt man bei dieser Methode eine nicht repräsentative Anreicherung der Transkripte. Durch die PCR-Amplifikation werden abundante Transkripte vergleichsweise häufiger vervielfältigt als seltene mRNAs.

Im weiteren Verlauf gelang es, durch Vergrößerung der Stammzucht von *E. coronatus* und neuen Verfahren für die Isolierung der Kokons aller Embryonalstadien genügend Poly-A-mRNA aus Embryonen zu isolieren, um eine nicht PCR-basierte cDNA-Bibliothek herzustellen.

Ein kritischer Punkt bei der Generierung von cDNA-Bibliotheken ist die Erststrangsynthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase. Bei der Synthese von cDNA kann es zu Abbrüchen kommen, so dass die Reverse Transkriptase nicht die vollständige kodierende mRNA in cDNA übersetzt. Solche cDNAs gingen durch verschiedene Selektionsschritte, wie zum Beispiel Größenfraktionierung nur vermindert mit in die cDNA-Bibliothek ein. Beim Durchmustern der hergestellten Bibliotheken traten häufig fusionierte cDNAs auf, die einen Teil der gesuchten Sequenz enthielten, allerdings mit anderen cDNAs fusioniert waren. Die Ursache hierfür liegt in der nicht vollständigen Restriktion der Adapter-Oligonukleotide. Für die Ligation in den Phagemid-Vektor mussten die Adapter-Nukleotide restringiert werden, damit sie mit den Vektor-Schnittstellen kompatibel waren. Wurde der Adapter nicht restringiert, war eine Verschmelzung zweier cDNAs an dieser Stelle möglich. Dies sollte man bei einer Wiederholung der Experimente durch eine effizientere Restriktion verhindern.

Die Größe der zufällig isolierten cDNA-Fragmente lag zwischen 500 bp und 2,2 kb. Dies entspricht durchaus den Fragmentgrößen von vergleichbaren käuflichen Bibliotheken (Pquest *C. elegans* cDNA library, Invitrogen; Pquest *H. sapiens* cDNA library, Invitrogen). Bei einer kommerziellen Bibliothek liegt der Anteil der Vektoren, die keine cDNA beinhalten, bei ca. 10-15 %. Bei der TriplEx-Bibliothek konnte festgestellt werden, dass ca. 40 % der Plasmide keine cDNA enthielten. Bei der λ -Zap-Bibliothek waren ca. 25 % ohne cDNA. Diese Zahlen besitzen für selbst hergestellte Bibliotheken normale Werte.

Der Primär-Titer einer cDNA-Bibliothek ist ein weiterer wichtiger Index für die Güte der erstellten Bibliothek. Je höher der Titer, desto mehr unabhängige Klone befinden sich in der Bibliothek und desto wahrscheinlicher ist es, dass sämtliche vorhandenen mRNAs, die exprimiert werden, in der Bibliothek vertreten sind. Ein primärer Titer von mehr als 10^7 Pfu/ml für eine nicht amplifizierte Bibliothek ist als sehr gut anzusehen. Käuflich zu erwerbende cDNA-Bibliotheken besitzen oft einen Titer von ca. 10^7 Pfu/ml (NCBI GenBank; Kriegler, M., 1990) im nicht amplifizierten Zustand. Bei über 10^7 Pfu/ml sollten selbst seltenere Transkripte mehrfach vorhanden sein und bei Bedarf isoliert werden können. Ausgehend von den Genomgrößen und der Zahl vorhergesagter Gene anderer Referenzorganismen sollte man postulieren, dass man mit den erreichten Titern der beiden hergestellten Bibliotheken von ca. 10^7 Pfu/ml sämtliche zu diesem Zeitraum exprimierten Gene in mehrfacher Kopienzahl vertreten haben sollte. So liegt die haploide Genomgröße von *E. coronatus* bei zirka 4×10^9 bp (A. Paululat, pers. Mitteilung). Im Vergleich dazu umfasst das haploide Genom von *D. melanogaster* $1,4 \times 10^8$ bp mit ca. 13500 vorausgesagten Genen (Adams *et al.*, 2000), das Genom von *C. elegans* 8×10^7 bp und 19 000 vorausgesagte Gene (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) und das Genom von *H. sapiens* 3×10^{11} bp und 30 000 Genen (Celera, 2001).

5.2. Das RTK1-Fragment aus *E. coronatus*

FGFR-Orthologe besitzen in den verschiedenen Organismen eine Länge zwischen 660 und über 1000 Aminosäuren. Innerhalb der Aminosäuresequenz gibt es eine hochkonservierte Domäne, die Tyrosin-Kinase-Domäne (TK-Domäne), sowie 2-5 IG-Domänen und eine Transmembran-

Domäne. Die TK-Domäne zeigt eine Identität von über 50 % und eine Ähnlichkeit von über 60 % auf Aminosäureebene unter den verschiedenen Spezies. Die Durchmusterungen der beschriebenen TriplEx- und λ -Zap-cDNA-Bibliotheken mit einer heterologen *D.melanogaster heartless*-Sonde lieferte ein 1100 bp cDNA-Fragment (RTK1). In Northern Blot Experimenten mit diesem isolierten RTK1-Fragment als Sonde wurde ein Signal mit einer Größe von ca. 6 kb detektiert. Die fehlende Sequenz wurde über RT-PCR und neue Durchmusterungen zu isolieren versucht. Da davon auszugehen ist, dass die fehlende Sequenz 5' von der bereits isolierten Sequenz liegt, wurden hauptsächlich 5'-RACE-PCR Experimente durchgeführt. Mit Hilfe dieser Experimente konnten weitere 2 kb 5' von der bereits bekannten Region amplifiziert werden, so dass das assemblierte Fragment eine Gesamtlänge von 3,1 kb besitzt. Ein Großteil dieser isolierten Sequenz ließ sich in einen Leserahmen bringen. Dieser Leserahmen hat eine Größe von 687 Aminosäuren und endet mit dem Basentriplett TAA (Stopp). Der Translationsstart konnte bislang noch nicht definiert werden. Die Aminosäuresequenz der partiellen cDNA zeigt eine TK-Domäne, zwei IG-Domänen und eine TM-Domäne. Die Identität der TK-Domäne zu TK-Domänen FGFR-Homologer liegt bei über 50 % auf Aminosäureebene. Auch die IG-Domänen zeigen eine auffällige Übereinstimmung zu den IG-Domänen der FGFR-Familie. Diese hohe Konservierung läßt den Schluss zu, dass es sich bei dem isolierten Fragment aus *E. coronatus* um ein Ortholog der FGFR-Familie handelt, was auch durch phylogenetische Betrachtungen von RTK1 unterstützt wird. Ein ca. 200 bp großer Bereich N-terminal vor dem postulierten Leserahmen wies keinen eindeutigen Konsensus auf. Dieser Bereich wurde in mehreren RT-PCR-Experimenten unabhängig voneinander amplifiziert und sequenziert. Trotzdem war es nicht möglich, die Sequenz eindeutig zu beschreiben.

Es gibt Hinweise, die darauf deuten, dass sich der Translationsstart in diesem nicht eindeutig zu identifizierendem Bereich befindet. In der isolierten Sequenz 5' vor diesem Bereich häufen sich Basentriplets, die für ein Stopp-Kodon kodieren und zwar in allen drei möglichen Leserahmen. Dies würde allerdings eine sehr große 5'-untranslatierte Region von ca 2,5 kb fordern, wenn man das Ergebnis aus dem Northern Blot Experiment berücksichtigt. Das wäre ungewöhnlich, aber nicht unmöglich. Man könnte auch Überlegungen über die Größe der 3' untranslatierten Region anstellen. Bindet nämlich das Oligonukleotid für die Erststrangsynthese nicht am Poly-A-Ende der mRNA, sondern an einem Poly-A-Strang innerhalb des 3' untranslatierten Bereichs, erhält

man eine verkürzte cDNA, der das echte 3'-Ende fehlt. In mehreren Durchmusterungen und in weiteren 3'-RACE-PCR Experimenten konnten dafür keine Anhaltspunkte gefunden werden.

Ein möglicher Lösungsansatz wäre die Analyse der genomischen Sequenz. Mit Hilfe der genomischen Bibliothek von *E. coronatus* (Mavridou, 2001) sollte es möglich sein, genauere Aussagen über die fragliche Region zu treffen.

Das am 3'-Ende der cDNA weder ein Poly-A-Signal noch eine Poly-A-Sequenz zu finden ist, erklärt sich aus der Zusammensetzung der für die Erststrangsynthese eingesetzten Oligonukleotide. Diese bestehen nicht nur aus einer Poly-T-Sequenz, sondern auch noch aus 23 bzw. 30 weiteren Nukleotiden, die eine Restriktionsschnittstelle beinhalten und sind so konstruiert, dass sie sich an das 5'-Ende der Poly-A-Sequenz anlagern. Die übrigen Nukleotide überdecken die eigentliche cDNA-Sequenz und das mögliche Poly-A-Signal. Die für das Einbringen der cDNA in den Vektor notwendige Restriktion trennt diesen Bereich ab. Hier sollten 3'-RACE-PCR Experimente mit einem reinen Poly-T-Oligonukleotid Aufschluss bringen. Bislang war es nicht möglich, alternative 3'-Sequenzen zu isolieren.

5.3. Das RTK2-Fragment aus *E. coronatus*

Bei einer Durchmusterung der λ -Zap-cDNA-Bibliothek von *Enchytraeus coronatus* mit einem *E.c.* RTK1 Fragment als Sonde wurde eine weitere Rezeptor-Tyrosin-Kinase isoliert, die nach einem Datenbankvergleich auf Aminosäureebene der Ret-Familie zugeordnet werden konnte. Innerhalb der Ret-Orthologen ist nur die Tyrosin-Kinase-Domäne als Domäne konserviert. Doch diese ist so hoch konserviert, dass alle Orthologe dieser Familie eindeutig von anderen RTKs abgegrenzt werden können. So gelang es, das in *Enchytraeus* gefundene 1,8 kb große Fragment eindeutig der RET-Familie zuzuordnen. Hierbei ist die Tatsache interessant, dass in *Drosophila* das Ret-Ortholog ebenfalls bei der Durchmusterung einer embryonalen cDNA-Bibliothek mit einer *heartless*-Sonde gefunden wurde.

Wie bereits erwähnt, wurde auf das Ret-Fragment in den vorliegenden Untersuchungen nicht näher eingegangen.

5.4. Antikörperfärbung

In der vorliegenden Arbeit ist es mit Hilfe zweier kreuzreagierender Antikörper gelungen, ein Protokoll für Antikörperfärbungen an *E. coronatus* einzurichten und zu standardisieren. Dieses Protokoll wurde auf der Grundlage von Methoden erstellt, die bereits erfolgreich bei *E. japonensis* (Yoshida-Noro *et al.*, 1999), *D. melanogaster* (Karr and Alberts, 1986) und *C. elegans* (Finney and Ruvkun, 1990) eingesetzt wurden. Funktionierende Antikörper gegen RTK1-Orthologe wurden zum Beispiel erfolgreich für *D. melanogaster* generiert. Zur Immunisierung wurden die IG-Domänen von *Drosophila* Heartless benutzt. Derzeit laufen Arbeiten, die versuchen, die IG-Domänen von RTK als Fusionsprotein in *E. coli* zu exprimieren. Das dies möglich ist, konnte bereits für *E.c.* Twist gezeigt werden (Bergter, pers. Mitteilungen).

5.4.1. Antikörperfärbungen mit einem Anti-Tubulin Antikörper zeigen ein nicht verschmolzenes Strickleiternnervensystem

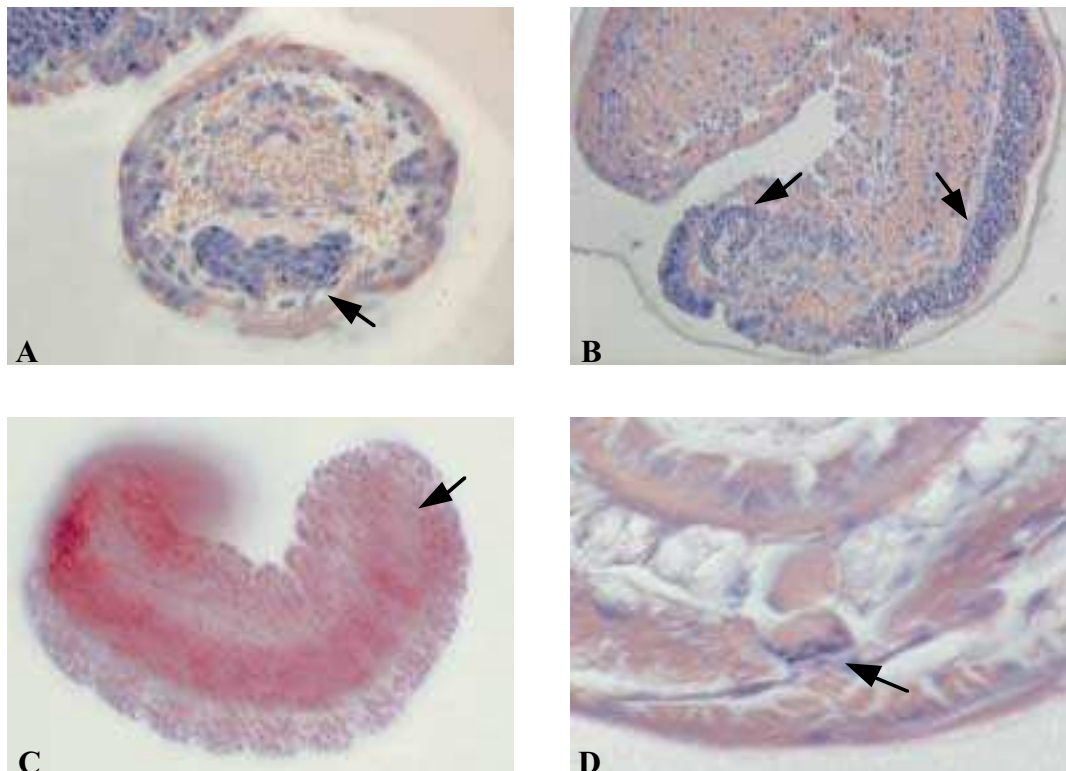


Abb. 5.1.: Histochemische Färbungen des Strickleiternnervensystems (aus: A. Bergter, 2001). Die Bilder A, B, und D zeigen eine Hämatoxylin/Eosin Doppelfärbung. Abbildung C zeigt eine

Fuchsinfärbung. (A) Querschnitt durch einen Embryo (Tag 8-9). Die untere Struktur stellt das verschmolzene Nervensystem dar. (B) Längsschnitt durch einen Embryo kurz vor dem Schlüpfen. Im linken Bereich ist das gut entwickelte Oberschlundganglion zu sehen, im rechten Bereich des Bildes sieht man das ventral verlaufende Bauchmark. (C) Ventralansicht auf das Bauchmark eines Tag 5 Embryos. Im posterioren Bereich ist das zusammenwachsende Bauchmark zu erkennen. (D) Ausschnittvergrößerung aus einem Querschnitt eines adulten *Enchytraeus*. Der blau eingefärbte Bereich stellt das ausdifferenzierte Bauchmark dar.

Bei der Antikörperfärbung mit dem Anti-Tubulin (acetyliert) Antikörper konnte man eindeutig das paarige Strickleiternnervensystem identifizieren (Abb. 4.19.). Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen. (Bergter, 2001; Ebershold, 1989), in denen das Bauchmark zwar als paarig angelegte Struktur beschrieben wurde, die aber im Laufe der Embryonalentwicklung zu einem kompakten Strang verschmilzt. Hier ist zu sehen, dass der Strang nicht vollständig verschmilzt, sondern als Struktur noch paarig vorliegt. Es war sogar möglich, einzelne Kommissuren zu erkennen.

5.6. *in situ* Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wird dazu benutzt, um mit Hilfe einer genspezifischen Sonde das Expressionsmuster eines spezifischen Gens darzustellen. Die Methode an sich konnte bereits bei anderen Anneliden etabliert werden, zum Beispiel bei *Helobdella* (Kostriken and Weisblat, 1992; Kourakis *et al.*, 1997), *Pristina* (Bely and Wray, 2001), *Platynereis* (Arendt *et al.*, 2001) und *Hirudo* (Wysocka-Diller *et al.*, 1989).

Aufgrund des erhaltenen Signals bei Northern Blot Experimenten mit embryonaler RNA und einem RTK1 Fragment als Sonde, ist davon auszugehen, dass *rtk1* embryonal exprimiert wird. Um ein möglichst großes Zeitfenster der Embryonalentwicklung abzudecken, wurden Embryonen aus verschiedenen Entwicklungsstadien und Paraffin-Gewebeschnitte verwendet, um *in situ*-Hybridisierungen durchzuführen. Hierfür wurden die isolierten RTK-Fragmente als Sonden verwendet. In einem Versuchsverlauf, der an gängige Protokolle anderer Organismen angelehnt war (Tautz and Pfeifle, 1989; Kostriken and Weisblat, 1992; Bely and Wray, 2001), wurde versucht, ein Nachweis für *rtk*-Transkripte in Embryonalstadien zu erzielen. Unter den bislang

durchgeführten Bedingungen des verwendeten Protokolls konnte bisher keine spezifische Färbung erzielt werden. Weder war ein spezifisches Muster in den „whole-mount“ Präparaten zu sehen, noch konnte eine eindeutige Färbung in den Schnitten identifiziert werden. Um die Durchlässigkeit des Gewebes zu gewährleisten, wurden die Zeiten der Proteasebehandlung bis auf 20 min heraufgesetzt. Auch die Konzentration der Protease K wurde bis auf 10 µg/ml heraufgesetzt. Eine weitere Variable war die Hybridisierungstemperatur, die bis zu einem Minimum von 40 °C herabgesetzt wurde. Obschon diverse Parameter verändert wurden, wurde bislang noch keine erfolgreiche Hybridisierung durchgeführt. Es sollte es dennoch möglich sein, das Transkript im Embryo nachzuweisen.

5.6.1. *In situ*-RT-PCR an *Enchytraeus coronatus*

Diese Methode wird ebenfalls dazu benutzt, um das Expressionsmuster eines spezifischen Gens darzustellen. Bei dieser Methode wird kein Fragment des zu untersuchenden Gens als Sonde markiert, sondern mittels einer RT-PCR versucht, die spezifische RNA direkt im Gewebe zu amplifizieren. Der Nachweis erfolgte über DIG-markierte Nukleotide, die bei dieser Reaktion in das Amplifikat eingebaut wurden. Nach mehreren Versuchen gelang es mit RTK1 spezifischen Oligonukleotiden, eine Färbung im Nervensystem zu erzeugen (Abb. 4.16.). Man konnte diesen Versuch mehrfach wiederholen, allerdings trat diese Färbung auch in einer Kontrolle auf, in der die PCR kein Amplifikat ergeben sollte. Hierbei wurden RTK1-Oligonukleotide eingesetzt, die keinen Bereich amplifizieren sollten (Abb. 5.2.).



Abb. 5.2.: Darstellung der für die *in situ* RT-PCR verwendeten Oligonukleotide. Für die eigentliche PCR wurde die Kombination Fw 4 und Rv 2 verwendet. Für die Kontrolle, die ebenfalls eine Färbung zeigte, wurden die Nukleotide Fw 3 und Rv 2 benutzt. Dabei sollte diese Kombination kein Amplifikat ergeben.

Diese Färbung lässt zwei Schlüsse zu:

1. Die Färbung ist unspezifische Hintergrundfärbung. Da die PCR in der Kontrolle eigentlich kein Amplifikat erzeugen sollte, kann die Färbung nur aufgrund unspezifischer Bindungen der DIG-

markierten Oligonukleotide an Strukturen des Nervensystems erfolgen. Allerdings konnte in keiner anderen Negativkontrolle diese unspezifische Färbung beobachtet werden.

2. Die Färbung zeigt eine spezifische Expression von RTK1 im Nervensystem

Da es theoretisch auch möglich ist, mit nur einem Oligonukleotid ein Amplifikat zu erzeugen, könnte man davon ausgehen, dass auch in diesem Versuch die mRNA von *ret* revers transkribiert und amplifiziert wurde. Man würde allerdings erwarten, dass diese Färbung nicht so stark ist, wie die ursprüngliche *in situ* RT-PCR.

Eine endgültige Klärung dieser Ergebnisse war bis zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Weitere *in situ* RT-PCR Experimente mit spezifischen Oligonukleotiden, die aus einer isolierten E.c. twist-cDNA abgeleitet wurden, konnten bislang ebenfalls keine Färbung zeigen.

5.7. Mögliche Funktion von RTK1

Zu diesem Zeitpunkt ist es nicht möglich, eindeutige Aussagen über die Funktion von RTK1 zu treffen. Lediglich Spekulationen unter Berücksichtigung der *in situ* Färbungen und der Funktion anderer RTK1-Orthologer sind möglich. Dabei kann es allerdings durchaus sein, dass das Gen eine andere Funktion besitzt, als seine Orthologen. Dies ist zum Beispiel der Fall bei den Orthologen von *twist* und *mef* innerhalb ihrer Genfamilien. Diese Gene besitzen bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* essentielle Funktionen während der Differenzierung des Mesoderms (Baylies *et al.*, 1998). Die Mutanten von *Drosophila twist* sind embryonal letal, die Mutanten von *mef* zeigen keinerlei Muskulatur (Lilly *et al.*, 1994). Bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zeigen die Mutanten von *Ce-twist* zwar einen Defekt einiger Muskelderivate, aber sie sind beweglich und fertil (Corsi *et al.*, 2000). Null-Allele von *Ce-mef* haben keinerlei Effekt auf die Muskulatur-Differenzierung (Dichoso *et al.*, 2000; Übersicht in: Baylies and Michelson, 2001).

Dies zeigt, dass man nicht unbedingt von der allgemeinen Funktion der Gen-Familie in den Spezies ausgehen kann, wenn man Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens machen will. Bei dem hier untersuchten Gen RTK1 könnte man eine Funktion vermuten, wenn man die *in situ* Expression berücksichtigt. Dieses Gen könnte eine Funktion bei der Differenzierung des Nervensystems haben. Betrachtet man die Funktion, die die FGFR Familie bei *Drosophila* hat, so

kann man feststellen, dass der zweite FGFR, das Gen *breathless* in der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielt (Klämbt *et al.*, 1992). Sollte es nur ein Gen bei den Anneliden geben, so ist es möglich, dass dieses Gen auch eine Funktion bei der Entwicklung des Nervensystems hat.

5.8. Ausblick

Das vornehmliche Ziel weiterer Arbeiten sollte die Isolierung der vollständigen cDNA von *Enchytraeus coronatus* RTK1 sein, ebenso wie die Aufklärung der Sequenz des noch nicht eindeutig sequenzierten Bereichs. Hier sind als Methoden vor allem weitere PCR-Experimente und die Durchmusterung der genomischen Bibliothek mit einer RTK1-cDNA als Sonde zu nennen. Anhand isolierter genomischer Fragmente sollten sich auch Aussagen über die allgemeine Struktur und die Organisation der Gene von *Enchytraeus coronatus* treffen lassen, wie zum Beispiel Exon-Intron Strukturen und Promotor-Bereiche.

Ein anderes Ziel ist die Funktionsanalyse von RTK1 *in vivo*. Dies ist vor allem durch *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen zu erreichen. Auch sollte es möglich sein, die bisher erhaltene Färbung zu bestätigen oder zu widerlegen. Momentan wird versucht, einen Antikörper gegen die IG-Domänen von RTK1 herzustellen.

Weitergehende Funktionsanalysen basieren auf der Grundidee, Gene von *Enchytraeus coronatus* in *Drosophila melanogaster* durch Mikroinjektion einzuschleusen. Die dafür benutzen Embryonen von *D. melanogaster* sollten eine Mutation tragen, dass das *heartless*-Gen nicht aktiviert ist. Ist es so möglich zum Beispiel die ausbleibende Herz-Entwicklung doch einzuleiten, hat man einen direkten Hinweis auf die Funktion des Gens.

6. Literaturverzeichnis

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wiy, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarri, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirska, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C. (2000)

The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.

Science **287**(5461):2185-2195

Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., and de Rosa, R. (1999)

Animal evolution-the end of the intermediate taxa?

Trends in Genetics **15**(3): 104-108

Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B., and de Rosa, R. (2000)

The new animal phylogeny: reliability and implications.

Proc Natl Acad Sci U S A. **97**(9):4453-4456

Aguinaldo, A.M., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., Lake, J.A. (1997)

Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals.

Nature **387**(6632):489-93.

Albert, R. (1975)

Zum Lebenszyklus von *Enchytraeus coronatus*, Nielsen u. Christensen, 1959 (Oligochaeta)

OIKOS **20**: 54-66

Arendt, D., Technau, U., and Wittbrodt, J. (2001)

Evolution of the bilaterian larval foregut.

Nature **409**(6816):81-85

Bate, M. (1990)

The embryonic Development of larval muscles in *Drosophila*.

Development **110**: 791-894

Bate, M. (1993)

The mesoderm and its derivatives. In the development of *Drosophila melanogaster*,

Vol.2 M. Bate and A. Martinez-Arias, eds. Cold Spring Harbor, NY: CSH laboratory Press), pp.1013-1090

Baylies, M.K., Bate, M., and Ruiz Gomez, M. (1998)

Myogenesis: a view from *Drosophila*.

Cell **93**(6):921-7

Baylies, M.K. and Michelson, A.M. (2001)

Invertebrate myogenesis: looking back to the future of muscle development

Curr. Op. Gen. Dev. **11**:431-439

Bely, A.E. and Wray, G.A. (2001)

Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from *engrailed*- and *orthodenticle*-class gene expression.

Development **128**(14):2781-91

Bergter, A. (2001)

Morphologische und histologische Untersuchung der Embryonalentwicklung des terrestrischen Enchytraeiden *Enchytraeus coronatus*, Nielsen und Christensen, 1959 (Oligochaeta)

Diplomarbeit Philipps-Universität, Marburg

Beiman, M., Shilo, B.Z., and Volk, T. (1996)

Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages.

Genes Dev. **10**(23):2993-3002.

Bernstein, S.I., O'Donnell, P.T., and Cripps, R.M. (1993)

Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in *Drosophila*.
Int Rev Cytol. **143**:63-152.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979).

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant Plasmid DNA
Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1523

Bocquet-Muchembled, B., Leroux, R., Chotteau-Lelievre, A., and Fontaine, F. (2001)

Isolation of a member of *ets* gene family in the polychaete annelid *Perinereis cultrifera*.
DNA Seq **2**:121-124

Brady, G. and Iscove, N.N. (1993)

Construction of cDNA libraries from single cells.
Methods Enzymol **225**:611-623

Brand, C. (1999)

Immunohistologische Analyse der Embryonalentwicklung von *Enchytraeus coronatus* (Annelida, Oligochaeta) und Klonierung eines *twist*-Homologen Genfragments zur Untersuchung der Mesoderm differenzierung
Diplomarbeit Philipps-Universität, Marburg

C. elegans Sequencing Consortium (1998)

Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium
Science **282**(5396):20122-20128

Celera Genomics Sequencing Team (2001)

The sequence of the human genome
Science 1304-1351

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem. **162**(1):156-9

Christen, R., Ratto, A., Baroin, A., Perasso, R., Grell, K.G., and Adoutte, A. (1991)

An analysis of the origin of metazoans, using comparisons of partial sequences of the 28S RNA, reveals an early emergence of triploblasts.
EMBO J. **10**(3):499-503

Christensen, B. (1956)

Studies on Enchytraeidae: Technique for culturing Enchytraeidae with notes on Cocoon Types
Oikos **7**: 302-307

Church, G.M. and Gilbert, W. (1984)

Genomic sequencing.

Proc Natl Acad Sci.; **81**(7):1991-1995

Conklin, E.G. (1897)

The embryology of *Crepidula*

J.Morph. **13**: 1-226

Coriat, A.M., Muller, U., Harry, J.L., Uwanogho, D., Sharpe, P.T. (1993)

PCR amplification of *SRY*-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the *SRY*-box motif.

PCR Methods Appl. **2**(3):218-22

Corsi, A.K., Kostas, S.A., Fire, A., Krause, M. (2000)

Caenorhabditis elegans *Twist* plays an essential role in non-striated muscle development

Development, **127**: 2041-2051

Coulier, F., Pontarotti, P., Roubin, R., Hartung, H., Goldfarb, M., and Birnbaum, D. (1997)

Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families.

J Mol Evol. **44**(1):43-56

Crossley, A.C. (1987)

The morphology and development of the *Drosophila* muscular system

The Genetics and Biology of *Drosophila* 2b (ed. Ashburner, M., and Wright, G.H.T.), 499-560
Academic Press, London, New York

De Boer, W.I., Houtsmuller, A.B., Izadifar, V., Muscatelli-Groux, B., Van der Kwast, T.H., Chopin, DK. (1997)

Expression and functions of EGF, FGF and TGF β -growth-factor family members and their receptors in invasive human transitional-cell-carcinoma cells.

Int J Cancer. **71**(2):284-91.

de Martino, S., Yan, Y.L., Jowett, T., Postlethwait, J.H., Varga, Z.M., Ashworth, A., Austin, C.A. (2000)

Expression of *sox11* gene duplicates in zebrafish suggests the reciprocal loss of ancestral gene expression patterns in development.

Dev Dyn. **217**(3):279-92

Deverières, J. (1968)

Les premières étapes de la segmentation chez le Lombricien *Eisenia foetida*

Bull. Soc. Zool. France **93**: 87-97

Deverières, J. (1971)

Origine de la lignée germinale chez le Lombricien *Eisenia foetida*

Ann. Embryol. Morph. **4**:37-43

Deverières, J. (1973)

La formation et la destinée des feuillets embryonnaires chez le Lombricien *Eisenia foetida*
Arch. Anat. Microsc. **62**: 15-38

Deverières, J. (1985)

Pattern de clivage et détermination embryonnaire chez l'Oligochète *Eisenia foetida*
Arch. Biol. (Bruxelles) **96**: 291-313

DeVore, D.L., Horvitz H.R., Stern, M.J. (1995)

An FGF receptor signaling pathway is required for the normal cell migrations of the sex myoblasts in *C. elegans* hermaphrodites
Cell **83**(4): 611-620

Dichoso, D., Brodigan, T., Chwoe, K.Y., Lee, J.S., Llacer, R., Park, M., Corsi, A.K., Kostas, S.A., Fire, A., Ahnn, J., and Krause, M. (2000)

The MADS-Box factor *CeMEF2* is not essential for *Caenorhabditis elegans* myogenesis and development.
Dev Biol. Jul 15; **223**(2):431-440

Ebersold, B. (1989)

Untersuchungen zur Zucht und Funktionsmorphologie von *Enchytraeus coronatus* (Oligochaeta, Enchytraeidae)
Diplomarbeit Philipps-Universität, Marburg

Epstein, H.F., Waterson, R.H. and Brenner, S. (1974)

A mutant affecting the heavy chain of myosin in *C. elegans*.
J. Mol. Biol. **90**: 291-301

Erseus, C., Prestegaard, T., Källrjö, M., (2000).

Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 15, No 3, June, pp. 381-389

Fedorov, A., Johnston, H., Korneev, S., Blackshaw, S., and Davies, J. (1999)

Cloning, characterisation and expression of the alpha-tubulin genes of the leech, *Hirudo medicinalis*.
Gene **227**(1):11-9

Felsenstein J. (1981)

Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.
J Mol Evol. **17**(6):368-76

Ferraguti, M., Erseus, C. (1999)

Sperm types and their use for a phylogenetic analysis of aquatic clitellates.
Hydrobiologia **402**: 225-2237

Field, K.G., Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Ghiselin, M.T., Raff, E.C., Pace, N.R., Raff, R.A. (1988)

Molecular phylogeny of the animal kingdom.

Science **239**(4841 Pt 1):748-53

Finney, M. and Ruvkun, G. (1990)

The unc-86 gene produkt couples cell lineage and cell identity in *C. elegans*

Cell **63**: 895-905

Gisselbrecht, S., Skeath, J.B., Doe, C.Q., Michelson, A.M. (1996)

heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo.

Genes Dev. **10**(23):3003-17.

Glazer, L., Shilo, B.Z. (1991)

The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension.

Genes Dev. **5**:697-705

Goldstein, B., Leviten, M.W., and Weisblat, D.A. (2001)

Dorsal and *snail* homologs in leech development.

Dev Genes Evol. **211**(7):329-37

Goto, A., Kitamura, K. and Shimizu, T. (1999a)

Cell lineage analysis of pattern formation in the Tubifex embryo. I. Segmentation in the mesoderm

Int. J. Dev. Biol. **43**: 317- 327

Grieco, D., Santoro, M., Dathan, N.A., and Fusco, A. (1995)

Activated RET oncogene products induce maturation of xenopus oocytes.

Oncogene **11**(1):113-117

Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983)

A simple and very efficient method for generating complementary DNA libraries

Gene **25**: 263-269

Halanych, K.M., Bacheller, J.D., Aguinaldo, A.M., Liva, S.M., Hillis, D.M., and Lake, J.A. (1997)

Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals.

Science **267**(5204):1641-3

Harfe, B. and Fire, A. (1996)

Cetwist-like 1, a novel basic-helix-loop-helix protein that is aktive in the M lineage

Worm breeders Gazette **14**, 46

Harfe, B.D., Vaz Gomes, A., Kenyon, C., Liu, J., Krause, M., and Fire, A. (1998)

Analysis of a *Caenorhabditis elegans* Twist homolog identifies conserved and divergent aspects of mesodermal patterning.

Genes Dev. **12**(16):2623-35.

Hedges, S.B. (1992)

The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies.

Mol Biol Evol. **9**(2):366-369

Henry, J.J. and Martindale, M.Q. (1999)

Conservation and innovation in spiralian development

Hydrobiologia **402**: 255-265

Hopwood, N.D., Pluck, A., and Gurdon, J.B. (1989)

A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila twist* is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest.

Cell **59**(5):893-903

Hyman, L.H. (1940)

The invertebrates. *Protozoa through Ctenophora* (Vol I) McGraw-Hill

Irvine, S.Q. and Martindale, M.Q. (1999)

Expression patterns of anterior Hox genes in the polychaete *Chaetopterus*: correlation with morphological boundaries.

Dev Biol. **217**(2):333-51

Iwamoto, T., Taniguchi, M., Asai, N., Ohkusu, K., Nakashima, I., and Takahashi, M. (1993)

cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily.

Oncogene **8**(4):1087-91

Jamieson, B. G. M. (1981)

The Ultrastructure of the Oligochaeta

Academic Press, New York

Jay, P., Goze, C., Marsollier, C., Taviaux, S., Hardelin, J.P., Koopman, P., Berta, P. (1995)

The human *SOX11* gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression.

Genomics **29**(2):541-545

Jellies, J. and Kristan, W.B., Jr. (1988)

Embryonic assembly of a complex muscle is directed by a single identified cell in the medicinal leech

J. Neurosci. **8**: 3317-3326

Jellies, J. and Kristan, W.B., Jr. (1991)

The oblique muscle organizer in *Hirudo medicinalis*, an identified embryonic cell projecting multiple parallel growth cones in an orderly array
Developmental Biology **148**: 334-354

Jellies, J., Kopp, D.M., Johanson K.M., and Johanson, J. (1996)

Initial formation and secondary condensation of nerve pathways in the medicinal leech.
J. Comp. Neurol. **373**: 1-10

Juan, G., Traganos, F., James, W.M., Ray, J.M., Roberge, M., Sauve, D.M., Anderson, H., and Darzynkiewicz, Z. (1998)

Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis.
Cytometry **32**, 71-77

Kato, S., Sekine, S., Oh, S. W., Kim, M.S., Umezawa, Y., Abe, N., Yokoyama-Kobayashi, M., and Aoki, T. (1994)

Construction of a human full-length cDNA bank
Gene **150**: 243-250

Karr, T.L. and Alberts, B.M. (1986)

Organisation of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos
J Cell Biol **102**: 1494-1509

Klämbt, C., Glazer, L., Shilo, B.Z. (1992)

breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells.
Genes Dev **6**(9):1668-1678

Krause, M. (1995)

MyoD and myogenesis in *C. elegans*.
Bioessays **17**(13): 219-228

Kriegler, M. (1990)

Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes.
Methods Enzymol. **185**:512-527

Kostriken, R., Weisblat, D.A. (1992)

Expression of a Wnt gene in embryonic epithelium of the leech.
Dev Biol **151**(1):225-241

Kourakis, M.J., Mater, V.A., Lokhorst, D.K., Nardelli-Haefflinger, D., Wedeen, C.J., Martindale, M.S. and Shankland, M. (1997).

Conserved anterior boundaries of *Hox* gene expression in the central nervous system of the leech *Hellobdella*.
Dev. Biol. **190**: 284-300

Lans, D., Wedeen, C. J., and Weisblat, D. A. (1993)

Cell lineage analysis of the expression of an *engrailed* homolog in leech embryos
Development **117**: 857-871

Learner, M.A. (1972)

Laboratory studies on the life histories of four enchytraeid worm (Oligochaeta) which inhabit sewage percolation filters
Ann. appl. Biol. **70**: 252-266

Leptin M. (1991)

twist and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development.
Genes Dev. **5**(9):1568-76

Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N.J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, F.R., Ponting, C.P., and Peer Bork (2002)

Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource
Nucleic Acids Research **30** (1) 242-244

Lilly, B., Galewsky, S., Anthony, B. Firulli, Schulz, R.A., and Eric N. Olson (1994)

D-MEF2: A MADS box transkription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. **91**, pp5662-5666

Mallatt, J. and Winchell, C.J. (2002)

Testing the New Animal Phylogeny: First Use of Combined Large-Subunit and Small-Subunit rRNA Gene Sequences to Classify the Protostomes.
Mol Biol Evol. **19**(3):289-301

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1989)

Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd Edition
Cold Spring Harbour, New York

Marcos-Gutierrez, C.V., Wilson, S.W., Holder, N., Pachnis, V. (1997)

The zebrafish homologue of the *ret* receptor and its pattern of expression during embryogenesis.
Oncogene **14**(8):879-89

Mavridou, R. (2001)

Herstellung einer genomischen Cosmid-Bibliothek von *Enchytraeus coronatus* und Isolierung genomischer *Ecme2*-kodierender Klone
Diplomarbeit Philipps-Universität, Marburg

McCarrey, J.R. and Williams, S.A. (1994)

Construction of cDNA libraries from limiting amounts of material.
Curr Opin Biotechnol. **5**(1):34-39

Nardelli-Haeffliger, D. and Shankland, M. (1992)

Lox2, a putative *leech* segment identity gene, is expressed in the same segmental domain in different stem cell lineages.

Development **116**(3):697-710

Natarajan, A., Yamagishi, H., Ahmad, F., Li, D., Roberts, R., Matsuoka, R., Hill, S., Srivastava, D. (2001)

Human eHAND, but not dHAND, is down-regulated in cardiomyopathies.

J Mol Cell Cardiol **33**(9):1607-14

Olson, E.N., Klein, W.H. (1994)

bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out.

Genes Dev. **8**(1):1-8.

Paululat, A., Breuer, S., Renkawitz-Pohl, R. (1999a)

Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*.

Cell Tissue Res. **296**: 151-160

Paululat, A., Holz, A., Renkawitz-Pohl, R., (1999b)

Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis.

Mech. Dev. **83**(1-2):17-26.

Penners, A. (1922)

Die Furchung von *Tubifex rivulorum* Lam.

Zool. Jb. Anat. **43**:323-368, Taf. 10-11

Penners, A. (1924)

Die Entwicklung des Keimstreifs und die Organbildung bei *Tubifex rivulorum* Lam.

Zool. Jb. Anat. **45**: 251-308, Taf. 12-14

Penners, A. (1930)

Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an marinen Oligochäten. II. Furchung, Keimstreif und Keimbahn von *Pachydrilus* (Lumbricillus) *lineatus* Müll.

Zeitschr. f. wiss. Zool. **137**: 55-119

Pilon, M. and Weisblat, D.A. (1997)

A nanos homolog in leech.

Development **124**(9):1771-1780

Reidling, J.C., Miller, M.A., and Steele, R. (2000)

Sweet Tooth, a Novel receptor Protein-tyrosine Kinase with c-type Lecitin-like Extracellular Domains

Journal of Biological Chemistry **275**, 14: 10323-10330

Revie, D., Smith, D.W., and Yee, T.W. (1988)

Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions
Nucleic Acids Res **16**: 10301-10321

Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S.M., Michelson, A.M., and Bate, M. (1995)

Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development.
Development **121**: 1979-1988

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. (1977)

DNA sequencing with chain terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sc. **74**, 5463-5468

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullies, K.B., Ehrlich, H.A. (1988).

Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNAPolymerase.
Science **239**: 487-490

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. (1998)

SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains.
Proc Natl Acad Sci **26**;95(11):5857-5864

Shepard, A.R. and Rae, J.L. (1998)

Ion transporters and receptors in cDNA libraries from lens and cornea epithelia.
Curr Eye Res **17**(7):708-719

Seaver, E.C., Paulson, D.A., Irvine, S.Q., and Martindale, M.Q. (2001)

The spatial and temporal expression of *Ch-en*, the *engrailed* gene in the polychaete *Chaetopterus*, does not support a role in body axis segmentation.
Dev Biol **236**(1):195-209

Shimizu, T. (1982)

Development in the Freshwater Oligochaete *Tubifex*
In: Developmental Biology of Freshwater Invertebrates 283-316
(Eds. F.W. Harrison and R.R. Cowden) *Alan R. Liss*, New York

Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y., Saigo, K. (1993)

Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos
Development **117**, 751-761

Siddiqui, S.S., Aamodt, E., Rastinejad, F., and Culotti, J. (1989)

Anti-tubulin monoclonal antibodies that bind to specific neurons in *Caenorhabditis elegans*.
J. Neurosci. **9**: 2963-2972

Snow, P. and Buss, L.W. (1994)

HOM/Hox-type homeoboxes from *Stylaria lacustris* (Annelida: Oligochaeta).
Mol Phylogenet Evol. **3**(4):360-4

Sommer R.J. and Tautz D. (1994)

Expression patterns of *twist* and *snail* in *Tribolium* (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ band insects.
Dev Genet. **15**(1):32-7

Soto, J.G., Nelson, B.H., and Weisblat, D.A. (1997)

A leech homolog of *twist*: evidence for its inheritance as a maternal mRNA.
Gene. **199**(1-2):31-7

Southern, E.M. (1975)

Detecting of specific sequences among DNA fragments seperated by gel elektrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**: 503-517

Sparkes, A.C., Mumford, K.L., Patel, U.A., Newbury, S.F., Crane-Robinson, C. (2001)

Characterization of an SRY-like gene, DSox14, from *Drosophila*
Gene **272**(1-2):121-9

Steller, H. and Pirotta, V. (1986)

P transposons controlled by a heat shock promotor
Mol. Cell. Biol. **6**: 503-517

Stern, M.J. and Horvitz, H.R. (1991)

A normally attractive cell interaction is repulsive in two *C. elegans* mesodermal cell migration mutants.
Development. **113**(3):797-803.

Storey, K.G. (1989a)

Cell lineage and pattern formation in the earthworm embryo
Development **107**, 519-531

Storey, K.G. (1989b)

The effects of ectoteloblast ablation in the earthworm embryo
Development **107**: 533-545

Stover, N.A. and Steele, R.E. (2001)

Trans-spliced leader addition to mRNAs in a cnidarian.
Proc Natl Acad Sci **98**(10):5693-8

Sugaya, R., Ishimaru, S., Hosoya, T., Saigo, K., Emori, Y. (1993)

A *Drosophila* homolog of human proto-oncogene *ret* transiently expressed in embryonic neuronal precursor cells including neuroblasts and CNS cells
Mech. Dev. **45**: 139-145

Sulston, J.E., Schierenberg, E., White J.C., Thompson J.N. (1983)

The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*.
Dev. Biol. **100**: 64-119

Takahashi, M. and Cooper, G.M. (1987)

ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases.
Mol Cell Biol. **7**(4):1378-1385

Takahashi, M., Buma, Y., Iwamoto, T., Inaguma, Y., Ikeda, H., and Hiai, H. (1988)

Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains.
Oncogene **3**(5):571-8

Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989)

A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*.
Chromosoma **98**(2):81-85

Thisse, B., Stoetzel, C., Messal, M.E., and Perrin-Schmidt F. (1987)

Genes of the drosophila maternal dorsal group control the specific expression of the zygotic gene *twist* in presumptive mesodermal cells.
Genes and development **1**: 709-715

Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C. and Perrin-Schmidt, F. (1988)

Sequence of the *twist* gene and nuclear localisation of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos.
EMBO Journal **7**, No 7: 2175-2183

Trappmann, M. (1953)

Kleintiere im Boden. Die Enchytreen
Landbauforschung **3**, Heft 2

Wang, S.M., Coljee, V.W., Pignolo, R.J., Rotenberg, M.O., Cristofalo, V.J., and Sierra, F. (1997)

Cloning of the human *twist* gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues.
Gene **187**(1):83-92

Wolf, C., Thisse, C., Stoetzel, C., Thisse, B., Gerlinger, P., and Perrin-Schmitt, F. (1991)

The M-*twist* gene of Mus is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the Xenopus X-*twi* and the Drosophila *twist* genes.
Dev Biol **143**(2):363-73

Wong, V.Y., Aisemberg, G.O., Gan, W.B., and Macagno, E.R. (1995)

The leech homeobox gene Lox4 may determine segmental differentiation of identified neurons.
J Neurosci. **15**(8):5551-9

Wedeen, C.J. and Weisblat, D.A. (1991)

Segmental expression of an *engrailed*-class gene during early development and neurogenesis in an annelid.

Development **113**(3):805-14

Wysocka-Diller, J.W., Aisemberg, G.O., Baumgarten, M., Levine, M., and Macagno, E.R. (1989)

Characterization of a homologue of bithorax-complex genes in the leech *Hirudo medicinalis*.

Nature **341**(6244):760-3

Yoshida-Nero, C., Myohara, M., Kobari, F., and Tochinai, S. (2000)

Nervous system dynamics during fragmentation and regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida)

Dev Genes Evol **210**: 311-319

7. Abkürzungen

A. dest	destilliertes Wasser
Amp	Ampecillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberserum
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Boten-RNA
NBT	4-Nitrotetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
UTR	Untranslatierte Region
VT	Volumenteil
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-Phosphat